

대한민국 특허청

KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE

별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Intellectual
Property Office.

출원 번호 : 10-2003-0000987
Application Number

출원 년 월 일 : 2003년 01월 08일
Date of Application JAN 08, 2003

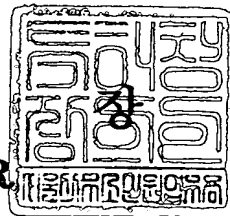
출원인 : 국립암센터
Applicant(s) NATIONAL CANCER CENTER



2003 년 04 월 09 일

특 허 청

COMMISSIONER



【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2003.01.08
【발명의 명칭】	β -카테닌 올리고뉴클레오티드 마이크로칩 및 이를 이용하여 β -카테닌 유전자의 돌연변이를 검사하는 방법
【발명의 영문명칭】	BETA-CATENIN OLIGONUCLEOTIDE MICROCHIP AND METHOD FOR DETECTING BETA-CATENIN MUTATIONS EMPLOYING SAME
【출원인】	
【명칭】	국립암센터
【출원인코드】	1-2000-036786-6
【대리인】	
【성명】	이현실
【대리인코드】	9-1999-000366-5
【포괄위임등록번호】	2001-073246-6
【대리인】	
【성명】	장성구
【대리인코드】	9-1998-000514-8
【포괄위임등록번호】	2001-073244-1
【발명자】	
【성명의 국문표기】	박재갑
【성명의 영문표기】	PARK, Jae-Gahb
【주민등록번호】	480525-1024415
【우편번호】	137-060
【주소】	서울특별시 서초구 방배동 임광아파트 6-8021
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	김일진
【성명의 영문표기】	KIM, Il-Jin
【주민등록번호】	760106-1811113
【우편번호】	138-180
【주소】	서울특별시 송파구 삼전동 9-12
【국적】	KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 강효정
【성명의 영문표기】 KANG,Hio Chung
【주민등록번호】 750913-2024710
【우편번호】 158-095
【주소】 서울특별시 양천구 신월5동 11-21
【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 박재현
【성명의 영문표기】 PARK, Jae-Hyun
【주민등록번호】 760223-1029611
【우편번호】 143-873
【주소】 서울특별시 광진구 자양2동 672 한솔리베르아파트 1602
【국적】 KR

【심사청구】 청구

【핵산염기 및 아미노산 서열목록】

【서열개수】 127
【서열목록의 전자파일】 첨부

【취지】 특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사를 청구합니다. 대리인
 이현실 (인) 대리인
 장성구 (인)

【수수료】

【기본출원료】	20 면	29,000 원
【가산출원료】	53 면	53,000 원
【우선권주장료】	0 건	0 원
【심사청구료】	6 항	301,000 원
【합계】		383,000 원
【감면사유】	정부출연연구기관	
【감면후 수수료】	191,500 원	

【첨부서류】 1. 요약서·명세서(도면)_1통

【요약서】**【요약】**

본 발명은 β -카테닌 (β -catenin) 유전자의 돌연변이 집중코돈 부위 (hot-spot areas)에서 발생가능한 다양한 돌연변이를 검색할 수 있도록 고안된 올리고뉴클레오티드들을 자동화된 미세배열기를 이용하여 고정 기판의 표면에 고정시켜 β -카테닌 유전자의 돌연변이를 검색할 수 있는 β -카테닌 올리고뉴클레오티드 마이크로칩, 상기 마이크로칩의 제조방법 및 이를 이용하여 β -카테닌 유전자의 돌연변이를 검사하는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 β -카테닌 올리고뉴클레오티드 마이크로칩은 기존의 일반적인 올리고뉴클레오티드 칩과는 달리 β -카테닌 유전자의 특정 돌연변이 집중코돈 부위에 대한 올리고뉴클레오티드를 선택적으로 고안함으로써 정확성과 경제성이 뛰어나 β -카테닌 유전자의 돌연변이 검색 및 β -카테닌 유전자와 관련된 신호전달 체계의 연구나 암 기전 연구에 유용하게 사용될 수 있다.

【대표도】

도 1

【명세서】**【발명의 명칭】**

β -카테닌 올리고뉴클레오티드 마이크로칩 및 이를 이용하여 β -카테닌 유전자의 돌연변이를 검사하는 방법{BETA-CATENIN OLIGONUCLEOTIDE MICROCHIP AND METHOD FOR DETECTING BETA-CATENIN MUTATIONS EMPLOYING SAME}

【도면의 간단한 설명】

도 1은 본 발명의 β -카테닌 올리고뉴클레오티드 마이크로칩을 이용하여 대장암 조직 시료에서 β -카테닌 돌연변이를 검색한 결과이고,

도 2는 본 발명의 β -카테닌 올리고뉴클레오티드 마이크로칩을 이용하여 β -카테닌 돌연변이가 확인된 대장암 조직 시료를 직접 염기서열 분석한 결과이고,

도 3은 본 발명의 β -카테닌 올리고뉴클레오티드 마이크로칩을 이용하여 β -카테닌 돌연변이가 확인된 대장암 조직 시료를 PCR-SSCP로 분석한 결과이다.

【발명의 상세한 설명】**【발명의 목적】****【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】**

<4> 본 발명은 β -카테닌 유전자의 돌연변이를 검색하기 위한 β -카테닌 올리고뉴클레오티드 마이크로칩 (β -catenin oligonucleotide microchip), 상기 마이크로칩의 제조방법 및 이를 이용하여 β -카테닌 유전자의 돌연변이를 검사하는 방법에 관한 것이다.

<5> β -카테닌 (β -catenin)은 Wnt 신호기작 (Wnt signaling pathway)에서 하류 전사 활성인자 (downstream transcriptional activator)로 작용할 뿐만 아니라 캐드헤린-매개성 세포-세포 부착 시스템 (cadherin-mediated cell-cell adhesion system)의 막성 구성성분 (submembrane component)으로 알려져 있다 (Abraham, S. C. et al., *Am. J. Pathol.* 158:1005-1010, 2001; Abraham, S. C. et al., *Am. J. Pathol.*, 158:1073-1078, 2001). GSK-3 β (glycogen synthase kinase-3 β)와 함께 APC (adenomatous polyposis coli) 종양 억제인자 단백질은 β -카테닌 유전자의 엑손 3 내 세린/쓰레오닌 (serine/threonine) 잔기의 인산화를 촉진하여 분해 (degradation)를 야기한다 (Araham, S. C. et al.,

Am. J. Pathol., 158:1073-1078, 2001). 그러나, APC 유전자의 절단 돌연변이 (Truncation mutation) 또는 β -카테닌 유전자 돌연변이에 의한 안정화는 β -카테닌 단백질의 축적 및 β -카테닌 조절 활성 (regulatory activity)의 소실을 가져온다 (Abraham, S. C. et al., *Am. J. Pathol.*, 158:1073-1078, 2001). 대부분의 β -카테닌 돌연변이는 자궁내막암 (endometrial cancer), 위암, 난소암, 간모세포종양 (hepatoblastomas) 또는 결장직장암과 같은 다양한 인간 종양에서 GSK-3 β 인산화 부위, 예를 들면 Ser-33, Ser-37, Thr-41, Ser-45 및 다른 잔기들 (Asp-32 및 Gly-34)에서 특이적인 것으로 보고되고 있다 (Saegusa, M. and Okayasu, I. *J. Pathol.*, 194:59-67, 2001). 결장직장암에서 0 내지 16%에 이르는 다양한 빈도의 β -카테닌 돌연변이가 보고된 바 있고 (Nilbert, M. and Rambech, E. *Cancer Genet. Cytogenet.* 128:43-45, 2001; Mirabelli-Primdahl, L. et al., *Cancer Res.* 59:3346-51, 1999), 대부분의 β -카테닌 돌연변이가 엑손 3 내 몇몇 코돈에 제한적이며, 아미노산의 변화를 가져오는 과오 돌연변이 (missense mutation)의 형태인 것으로 알려져 있다 (Devereux, T. R. et al., , 31:68-73, 2001; Udatsu, Y. et al., *Pediatr. Surg. Int.* 17:508-512, 2001; Koch, A. et al., *Cancer Res.* 59:269-273, 1999; de La Coste, A. et al., , 95:8847-8851, 1998).

<6> β -카테닌 유전자의 돌연변이를 검출하기 위하여 PCR-SSCP (single strand conformation polymorphism) 또는 직접 염기서열 분석 등의 종래 방법을 이용할 수도 있으나, 종래의 방법들을 이용한 β -카테닌 유전자의 돌연변이 검출이 낮은 민감도와 번거로움을 갖기 때문에 기술적인 어려움이 따르고 있다 (Abraham, S. C. et al., *Am. J. Pathol.* 158:1005-1010, 2001). 따라서, β -카테닌 유전자를 위하여 신뢰성 있고 신속

한 돌연변이 검출방법의 개발이 요구되고 있으며 이러한 검출방법은 종양 연구, 특히 Wnt 신호-관련 기작 연구에 유용하게 사용될 수 있을 것이다.

<7> 한편, 고빈도 MSI (microsatellite instability, MSI-H) 결장직장 암종은 대체로 APC 돌연변이를 갖지 않는 것으로 알려져 있고 (Mirabelli-Primdahl, L. et al., *Cancer Res.* 59:3346-51, 1999), β -카테닌 유전자 돌연변이는 주로 MSI-H 결장직장 암종에서 유도되는 것으로 보고된 바 있다 (Mirabelli-Primdahl, L. et al., *Cancer Res.* 59:3346-51, 1999; Shitoh, K. et al., *Genes Chromosomes Cancer* 30:32-37, 2001; Samowitz, W. S. et al., *Cancer Res.* 59:1442-1444, 1999). 또한, MSI-H 결장직장 암종은 근위 결장암의 경우에 종양의 위치에도 관여하는 것으로 알려지고 있다 (Mirabelli-Primdahl, L. et al., *Cancer Res.* 59:3346-51, 1999; Traverso, G. et al., *Lancet.* 359:403-404, 2002). 그러나, β -카테닌 돌연변이와 근위 결장암 사이의 연관 관계는 아직까지 명확하게 연구되지 않은 실정이다.

<8> 트라베르소 등은 MSI를 근위 결장암을 진단하기 위한 진단마커로 사용하였고 (Traverso, G. et al., *Lancet.* 359:403-404, 2002), 몇몇 다른 마커들, 예를 들면 APC, p53, long DNA, 및 K-ras와 같은 마커들 또한 배설물 DNA를 사용한 결장직장암의 진단에 사용되어 왔다 (Ahlquist, D. A. et al., *Gastroenterology* 119:1219-1227, 2000; Dong, S. M. et al., *J. Natl. Cancer. Inst.* 93:858-865, 2001).

<9> 이에 본 발명자들은 근위 결장암에서 β -카테닌 돌연변이가 많이 발생하므로 β -카테닌 돌연변이를 근위 결장암을 진단하는데 사용할 수 있음을 확인하고 자동화된 미세배열기를 이용하여 β -카테닌 유전자의 돌연변이 집중코돈 부위에서 발생가능한 다양한 돌연변이를 검색할 수 있도록 고안된 올리고뉴클레오타이드들을 고형 기관의 표면에 고정시



켜 β -카테닌 유전자의 돌연변이를 검색할 수 있는 β -카테닌 올리고뉴클레오티드 마이크로칩을 개발하고, 상기 마이크로칩을 이용하여 β -카테닌 유전자의 돌연변이를 효과적으로 검사하는 방법을 개발함으로써 본 발명을 완성하였다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

<10> 본 발명의 목적은 β -카테닌 유전자의 돌연변이 검색 및 β -카테닌 유전자와 관련된 신호전달 체계의 연구나 암 기전 연구에 유용하게 사용될 수 있는 β -카테닌 올리고뉴클레오티드 마이크로칩을 제공하는 것이다.

<11> 본 발명의 또 다른 목적은 β -카테닌 올리고뉴클레오티드 마이크로칩을 이용하여 β -카테닌 유전자의 돌연변이를 검사하는 방법을 제공하는 것이다.

【발명의 구성 및 작용】

<12> 상기 목적에 따라, 본 발명은 β -카테닌 유전자의 돌연변이 집중코돈 부위의 다양한 돌연변이를 검색할 수 있도록 고안된 올리고뉴클레오티드들을 자동화된 미세배열기를 이용하여 고형 기판의 표면에 고정시켜 β -카테닌 유전자의 돌연변이를 검색할 수 있는 β -카테닌 올리고뉴클레오티드 마이크로칩을 제공한다.

<13> 또한, 본 발명은 상기 β -카테닌 올리고뉴클레오티드 마이크로칩의 제조방법을 제공한다.

<14> 아울러, 본 발명은 상기 β -카테닌 올리고뉴클레오티드 마이크로칩을 이용하여 β -카테닌 유전자의 돌연변이를 검사하는 방법을 제공한다.

<15> 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

<16> 본 발명은 자동화된 미세배열기를 이용하여 β -카테닌 유전자의 돌연변이 집중코돈 부위의 다양한 돌연변이를 검색할 수 있는 올리고뉴클레오티드들을 고정 기판의 표면에 고정시켜 β -카테닌 유전자의 돌연변이를 검색할 수 있도록 고안된 β -카테닌 올리고뉴클레오티드 마이크로칩 (이하 " β -카테닌 올리고 칩"으로 약칭함)을 제공한다.

<17> 우선, 본 발명은 β -카테닌 유전자의 돌연변이 집중코돈 부위인 엑손 3의 11개 코돈 (29, 31, 32, 33, 34, 35, 37, 38, 41, 45 및 48 코돈)에서 발생가능한 과오 돌연변이 (missense mutation) 및 해독틀내 결실 (in-frame deletion) 돌연변이를 검색할 수 있는 다양한 올리고뉴클레오티드를 고안한다.

<18> β -카테닌 유전자의 돌연변이는 다양한 인간의 악성종양 (malignancies)에서 분리되었는데, 이들 대부분은 엑손 3의 돌연변이 집중코돈 부위 (hot-spot areas)에 한정된 과오 돌연변이로 알려져 있다. β -카테닌 유전자의 돌연변이는 결장직장암과 매우 깊은 관련이 있는데, β -카테닌 돌연변이의 70% 이상이 결장직장암에서 보고되었으며 이들 중 90%는 11개의 코돈 (코돈 29, 31, 32, 33, 34, 35, 37, 38, 41, 45 및 48)에서 과오 (missense) 돌연변이 및 해독틀내 결실 (in-frame deletions) 돌연변이의 형태로 발견되었다.

<19> 이에, 본 발명에서는 이러한 돌연변이 집중코돈을 대상으로 돌연변이를 검색할 수 있도록 고안된 올리고뉴클레오티드들을 사용한다. 본 발명의 대상 유전자인 β -카테닌 유전자의 돌연변이는 유전자의 특성상 돌연변이의 90% 이상이 특정한 11개 코돈에서 단 한 개의 염기가 변형된 과오 돌연변이 및 해독틀내 결실의 형태로 나타난다. 따라서,

이러한 β -카테닌 유전자의 특성을 고려하여 제작된 본 발명의 β -카테닌 올리고 칩은 β -카테닌 유전자의 돌연변이 검색률을 90% 이상으로 높일 수 있다. 또한, 총 11개의 코돈에 대한 올리고뉴클레오티드가 집적되어 있는 β -카테닌 올리고 칩의 경우, 대부분의 돌연변이가 발생하는 11개 코돈에서는 유발 가능한 모든 파오 돌연변이를 검색할 수 있도록 올리고뉴클레오티드가 고안되어 있어 11개 코돈에서 아직 보고되지 않은 파오 돌연변이가 발생하는 경우에도 이를 검색할 수 있으며, 각 코돈에 대한 해독틀내 결실 (3 bp 결실)도 검색할 수 있다. 즉, 본 발명의 β -카테닌 올리고 칩은 일반적인 올리고 칩과는 달리 유전자의 특성을 파악하여 돌연변이 집중코돈 부위에 대한 올리고뉴클레오티드를 선택적으로 고안함으로써 돌연변이 검색의 정확성과 경제성을 동시에 향상시킬 수 있다.

<20> 구체적으로, 본 발명의 β -카테닌 올리고 칩은 바람직하게는 β -카테닌 유전자의 돌연변이 집중코돈 부위인 11개 코돈 각각에서 발생가능한 모든 파오 돌연변이를 검사할 수 있는 99개 타입의 올리고뉴클레오티드, 11개 코돈 각각에 대한 해독틀내 결실을 검사할 수 있는 11개 타입의 올리고뉴클레오티드 및 11개 코돈 각각에 대하여 정상형 코돈을 검사할 수 있는 올리고뉴클레오티드를 1개씩 고품 기판의 표면에 집적시켰으며, 각각의 올리고뉴클레오티드는 정확한 실험 데이터를 얻기 위해 4번 반복하여 집적되어 있어, 총 484개가 집적되어 있다.

<21> 11개의 코돈 29, 31, 32, 33, 34, 35, 37, 38, 41, 45 및 48 각각에 대하여 9개의 파오 돌연변이를 갖는 올리고뉴클레오티드 (M), 1개의 해독틀내 결실을 갖는 올리고뉴클레오티드 (D) 및 1개의 정상형 올리고뉴클레오티드 (W)를 집적시킨다. 구체적으로, 코돈 29는 TCT가 ACT, GCT, CCT, TAT, TGT, TTT, TCA, TCG 및 TCC로 변형된 9개의 올리고

뉴클레오티드와 TCT 부위에서 3 bp가 결실된 1개의 올리고뉴클레오티드를 포함하고, 코돈 31은 CTG가 ATG, TTG, GTG, CAG, CGG, CCG, CTA, CTC 및 CTT로 변형된 9개의 올리고뉴클레오티드와 CTG 부위에서 3 bp가 결실된 1개의 올리고뉴클레오티드를 포함하고, 코돈 32는 GAC가 CAC, TAC, AAC, GCC, GTC, GGC, GAG, GAT 및 GAA로 변형된 9개의 올리고뉴클레오티드와 GAC 부위에서 3 bp가 결실된 1개의 올리고뉴클레오티드를 포함하고, 코돈 33은 TCT가 ACT, GCT, CCT, TGT, TAT, TTT, TCA, TCG 및 TCC로 변형된 9개의 올리고뉴클레오티드와 TCT 부위에서 3 bp가 결실된 1개의 올리고뉴클레오티드를 포함하고, 코돈 34는 GGA가 TGA, AGA, CGA, GTA, GCA, GAA, GGT, GGG 및 GGC로 변형된 9개의 올리고뉴클레오티드와 GGA 부위에서 3 bp가 결실된 1개의 올리고뉴클레오티드를 포함하고, 코돈 35는 ATC가 GTC, CTC, TTC, ACC, AGC, AAC, ATG, ATA 및 ATT로 변형된 9개의 올리고뉴클레오티드와 ATC 부위에서 3 bp가 결실된 1개의 올리고뉴클레오티드를 포함하고, 코돈 37은 TCT가 ACT, CCT, GCT, TAT, TGT, TTT, TCA, TCG 및 TCC로 변형된 9개의 올리고뉴클레오티드와 TCT 부위에서 3 bp가 결실된 1개의 올리고뉴클레오티드를 포함하고, 코돈 38은 GGT가 AGT, CGT, TGT, GAT, GCT, GTT, GGA, GGG 및 GGC로 변형된 9개의 올리고뉴클레오티드와 GGT 부위에서 3 bp가 결실된 1개의 올리고뉴클레오티드를 포함하고, 코돈 41은 ACC가 TCC, GCC, CCC, AGC, ATC, AAC, ACA, ACT 및 ACG로 변형된 9개의 올리고뉴클레오티드와 ACC 부위에서 3 bp가 결실된 1개의 올리고뉴클레오티드를 포함하고, 코돈 45는 TCT가 ACT, GCT, CCT, TGT, TAT, TTT, TCA, TCG 및 TCC로 변형된 9개의 올리고뉴클레오티드와 TCT 부위에서 3 bp가 결실된 1개의 올리고뉴클레오티드를 포함하고, 코돈 48은 GGT가 AGT, TGT, CGT, GAT, GCT, GTT, GGA, GGC 및 GGG로 변형된 9개의 올리고뉴클레오티드와 GGT 부위에서 3 bp가 결실된 1개의 올리고뉴클레오티드를 포함한다.

- <22> 각 코돈에는 1개의 정상 타입 올리고뉴클레오티드 (W)가 찍혀 있어 돌연변이 타입과 직접 비교가 가능하도록 하였으며 동형 돌연변이 (homozygous mutation)와 이형 돌연변이 (heterozygous mutation)를 모두 검색할 수 있도록 하였다. 예를 들어, 코돈 29에 12개의 올리고뉴클레오티드가 찍혀 있다면, 1개는 정상 염기 서열을 검색하기 위한 것이고 나머지 11개가 돌연변이 염기 서열을 검색하기 위한 올리고뉴클레오티드이다. 전체적으로 총 110 타입의 돌연변이를 검색할 수 있도록 구성되어 있고, 정상타입의 염기 서열을 검색하기 위한 11개 정상형 (wild type) 올리고뉴클레오티드가 찍혀 있다.
- <23> 이와 같이 구성된 올리고뉴클레오티드들을 자동화된 미세배열기를 이용하여 고형 기관의 표면에 고정시켜 β -카테닌 유전자의 돌연변이를 검색할 수 있는 β -카테닌 올리고 칩을 제작한다.
- <24> 상기 β -카테닌 올리고 칩을 제작하는 방법은
- <25> 1) 올리고뉴클레오티드를 집적 용액 (spotting solution)에 혼합하여 웰 플레이트에 분주하는 단계;
- <26> 2) 상기 올리고뉴클레오티드를 미세배열기를 이용하여 고형 기관의 표면에 집적하는 단계;
- <27> 3) 상기 기관을 상온에 방치하여 올리고뉴클레오티드를 기관에 고정시킨 후 세척하는 단계;
- <28> 4) 상기 기관을 95℃의 끓는 물에 담가 변성 (denaturation)시킨 후 붕소수소화 나트륨 (sodium borohydride) 용액에 담그는 단계;
- <29> 5) 상기 기관을 세척한 후 건조시키는 단계를 포함한다.

<30> 상기 단계를 보다 자세하게 설명하면, 단계 1)에서 모든 올리고뉴클레오티드는 고품질 기판과의 안정적인 결합을 형성할 수 있도록 작용기를 갖는 것이 바람직하며, 이를 위하여 12개의 탄소 스페이서 (carbon spacer)가 연결되어 있고, 5' 말단에 아미노 변형 (5' amino modification)이 이루어져 있다. 주문 합성된 탄소 스페이서 (Metabion, Germany)와 아민기를 올리고뉴클레오티드 5' 말단에 부착하였는데, 이는 $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_{12}-\text{올리고뉴클레오티드}$ 로 모식화하여 나타낼 수 있다. 올리고뉴클레오티드에 부착된 아민기는 슬라이드의 알데히드기와 공유결합을 이루어 집적시킨 올리고뉴클레오티드가 슬라이드 위에 단단한 결합을 이루도록 작용하며 아미노의 변형방법은 쉬프 염기 결합 (Schiff's base reaction)을 이용한 화학반응에 의하여 이루어진다. 또한, 12개의 카본 스페이서는 슬라이드 상의 올리고뉴클레오티드와 실제 형광이 표지된 환자의 DNA가 혼성화 반응을 할 경우 올리고뉴클레오티드가 보다 효율적으로 접근하여 혼성화 반응의 효율을 높이는 역할을 한다.

<31> 단계 1)에서 사용된 집적 용액 (micro spotting solution, TeleChem사)은 여러 가지 이온과 중합체를 포함하여 슬라이드 상에 올리고뉴클레오티드가 올바른 형태로 위치하도록 도와준다.

<32> 단계 2)에서 고품질 기판으로는 유리, 변형 실리콘, 플라스틱 카세트 또는 폴리카보네이트와 같은 중합체를 재료로 하고 임의의 형태를 갖는 기판이 사용될 수 있으며, 일반적으로 유리 기판이 가장 많이 사용되고 있다. 상기 기판의 표면은 올리고뉴클레오티드가 안정적으로 결합할 수 있도록 도와주는 화학물질로 코팅될 수 있으며, 바람직하게는 알데히드 (aldehyde) 또는 아민 (amine) 등의 화학물질로 코팅될 수 있다. 예를 들어, 알데히드로 코팅되어 있는 슬라이드 글래스를 사용하고 올리고뉴클레오티드의 아민

기와 슬라이드 글래스의 알데히드기가 쉬프 염기 결합 (Schiff's base reaction)을 통해 공유결합을 이루게 됨으로써 올리고뉴클레오타드가 슬라이드 위에 고정된다.

<33> 상기 단계에서 총 484개의 올리고뉴클레오타드가 자동화된 미세배열기를 이용하여 올리고 칩 기판 위에 정교하게 배열된다. 상기 올리고뉴클레오타드 스폿은 약 100~500 μm 의 직경을 갖는 원형인 것이 바람직하다. 상기 올리고 칩의 바람직한 예로서, 본 발명에서는 3.7 cm \times 7.6 cm의 크기를 갖는 알데히드 코팅된 슬라이드 글래스 표면에 484개의 올리고뉴클레오타드가 직경 130 μm 의 스폿 크기로 300 μm 간격을 두고 행과 열로 배열된다.

<34> 단계 3)에서는 올리고뉴클레오타드의 아민기와 고형 기판의 알데히드기 사이에 쉬프 염기 결합을 통한 공유결합이 형성되어 올리고뉴클레오타드가 고형 기판 표면에 고정되고, SDS, SSC, SSPE 등으로 세척하여 고정되지 않은 올리고뉴클레오타드를 제거한다.

<35> 단계 4)에서는 올리고뉴클레오타드를 집적시킨 후 올리고뉴클레오타드끼리 엉겨 있는 것을 바로잡기 위하여 기판을 95°C의 끓는 물에 담가 고농도로 집적된 올리고뉴클레오타드의 변성을 유도하고, 0.09 M 농도의 붕소수소화 나트륨 용액에 담가 쉬프 염기 결합을 하지 못하고 잔존하는 알데히드기를 불활성화시킨다.

<36> 상기와 같이 제작된 본 발명의 β -카테닌 올리고 칩은 기존의 일반적인 유전자의 돌연변이 검색 방법에 비하여 시간과 비용이 절감되어 매우 경제적이다. SSCP (Single Strand Conformational Polymorphism), PTT (Protein Truncation Test), 클로닝 (cloning), 직접 염기서열 분석 (direct sequencing) 등과 같은 기존의 유전자 돌연변이 검색 방법을 이용하여 한 유전자를 모두 검사하려면 평균적으로 수 일 내지 수개월이 소요된다. β -카테닌 유전자를 SSCP, 클로닝, 직접 염기서열 분석, RFLP (Restriction

Fragment Length Polymorphism) 등의 기존 분석방법에 의해 검사하는 경우 검사 완료까지 약 한달 가량이 소요되는 반면, 본 발명의 β -카테닌 올리고 칩을 이용하면 시료 DNA가 준비되어 있을 경우 약 10 내지 11시간 내에 결과를 얻을 수 있다. 또한, 본 발명의 β -카테닌 올리고 칩은 기존의 방법에 비해 시간뿐만 아니라 비용까지 절감할 수 있다. 한 번의 올리고뉴클레오티드 합성으로 몇 만장 이상의 슬라이드를 생산할 수 있고, 기존의 방법에 비해 매 실험 당 평균 절반 이하의 시약비가 소모되므로 연구자의 인건비까지 감안하였을 때 더욱 큰 비용의 절감효과를 기대할 수 있게 된다.

<37> 또한, 본 발명의 β -카테닌 올리고 칩은 일반적인 실험실에서 제작 및 사용이 용이하다. 기존에 어피메트릭스사 (Affimatrix)에서 광 석판인쇄 기법을 이용하여 올리고뉴클레오티드를 고형 기판 표면에 직접 합성하는 방법에 비하여, 본 발명의 β -카테닌 올리고 칩은 미리 합성한 올리고뉴클레오티드들을 핀 (pin) 방식의 미세배열기 (microarrayer)를 사용하여 고형 기판의 표면에 집적시키는 방법을 사용하므로 고도의 장비와 기술, 고가의 비용을 요구하는 기존의 방식에 비해 저렴한 가격에 올리고뉴클레오티드를 합성할 수 있고 일반적인 실험실 등에서도 제작 및 해석이 가능하여 그 적용범위가 매우 광범위하다.

<38> 더구나, 어피메트릭스사의 칩은 전용 혼성화 장치와 전용 스캐너를 갖추어야만 실험 진행이 가능한 반면, 본 발명의 β -카테닌 올리고 칩은 일반 DNA 칩 스캐너로 판독이 가능하고 혼성화 반응의 경우도 특수 장비 없이 수 작업으로 가능하기 때문에 일반 실험실에서도 저가의 비용으로 DNA 칩을 이용한 돌연변이 검색 실험을 수행할 수 있다.

<39> 아울러, 본 발명의 β -카테닌 올리고 칩은 올리고뉴클레오티드의 정제 및 변형이 매우 용이하다. 기존의 어피메트릭스사의 올리고 칩은 슬라이드 위에 직접 올리고뉴클

레오티드를 합성하므로 올리고뉴클레오티드의 정제와 변형이 어렵지만, 본 발명의 β -카테닌 올리고 칩은 올리고뉴클레오티드의 질을 높이기 위한 정제가 가능할 뿐만 아니라 한 장의 기판 위에 실험상의 오차를 줄이기 위해 반복적으로 올리고뉴클레오티드를 집적하는 등의 변형이 용이하게 이루어지므로 고 품질의 올리고뉴클레오티드를 고정시킬 수 있다. 올리고 칩의 경우 올리고뉴클레오티드 품질이 전체 반응의 정확도를 좌우함을 고려할 때 본 발명의 β -카테닌 올리고 칩은 이러한 조건을 충족시킨다 할 수 있다.

<40> 아울러, 본 발명은 상기 β -카테닌 올리고 칩을 이용하여 β -카테닌 유전자의 돌연변이 유무를 검사하는 방법을 제공한다.

<41> 본 발명의 β -카테닌 올리고 칩을 이용하여 β -카테닌 돌연변이를 검사하는 방법은

<42> 1) 대상 환자의 혈액으로부터 시료 DNA를 준비하는 단계;

<43> 2) 상기 시료 DNA와 β -카테닌 올리고 칩의 혼성화 반응을 수행하는 단계;

<44> 3) 상기 β -카테닌 올리고 칩을 세척하는 단계;

<45> 4) 스캐너로 결과를 해석하는 단계; 및

<46> 5) 돌연변이 유무를 확인하는 단계로 구성된다.

<47> 상기 단계를 보다 자세하게 설명하면, 단계 1)에서 시료 DNA는 대상 환자의 혈액으로부터 추출한 DNA에 형광염료를 부착하여 준비된다. 이후의 단계에서 표지된 DNA와 올리고 칩의 혼성화 반응 후 적당한 진동수의 빛을 쬔어 형광염료를 활성화시키고 발생된 형광의 패턴을 형광 판독기로 해독함으로써 반응을 검출할 수 있다. 예를 들면, 형광염

료로 Cy5, Cy3 등을 사용할 수 있으며, 이 외에 상업적으로 이용가능한 대부분의 형광 염료가 사용 가능하다.

<48> 단계 2)에서는 단계 1)에서 준비된 형광염료 부착 시료 DNA를 정제한 후 혼성화 반응용액과 혼합하여 β -카테닌 올리고 칩 기판 위에 적가하여 혼성화 반응을 수행한다. 혼성화 반응은 상기 올리고 칩을 수증기로 포화된 튜브 안에 넣은 채로 45 내지 60℃의 배양기 내에서 3 내지 9시간 동안 이루어진다.

<49> 단계 3)에서는 혼성화 반응이 끝난 올리고 칩을 SDS 또는 SSC로 세척한 후 물기를 제거하고 단계 4)에서 스캐너와 응용 프로그램을 이용하여 이미지 분석을 수행한다.

<50> 단계 5)에서는 99% 신뢰구간 상한값을 역치 (threshold)로 설정하여 양성 신호를 판별함으로써 각 코돈의 돌연변이 유무를 확인한다.

<51> 본 발명의 β -카테닌 올리고 칩을 이용하여 검사 가능한 종양으로는 결장직장암을 비롯하여 자궁내막암, 위암, 난소암, 간모세포종암 등이 있으며, 종양 연구뿐만 아니라 Wnt 신호 전달 체계에 관여하는 기작을 연구하는 데에도 매우 유용하게 사용될 수 있다. 따라서, 본 발명의 β -카테닌 올리고 칩은 이러한 암세포의 연구에 있어서 돌연변이 검색 방법으로 널리 이용 가능하다.

<52> 본 발명의 β -카테닌 올리고 칩을 이용하여 β -카테닌 돌연변이의 존재 유무를 확인하기 위하여 74종의 결장직장 암종들과 31종의 결장직장암 세포주들을 조사하였다 (도 1 참조). 74종의 결장직장암 조직에서는 5개의 β -카테닌 돌연변이가 근위 결장암 조직에서 발견되었지만 (N=34), 40종의 원위 결장직장암 조직에서는 검출되지 않았다. 5개의 β -카테닌 돌연변이들 중 4개는 코돈 32, 41 및 45에서의 점 돌연변이 (point mutation)

이었고, 나머지 하나는 코돈 45에서의 해독틀내 결실 (in-frame deletion; 3 bp 결실)이었다. 31종의 결장직장암 세포주에서는 4개의 β -카테닌 돌연변이가 발견되었다. 이들 4개 돌연변이들 중 3개는 코돈 45에서, 나머지 하나는 코돈 41에서 발견되었다.

<53> 전체적으로 9개의 돌연변이가 74종의 결장직장 암종 및 31종의 결장직장암 세포주로부터 분리·동정되었다. 이들 중 6개는 코돈 45에서, 2개는 코돈 41에서 발견되었는데, 코돈 45에서의 6개 돌연변이 중에서 4개는 동일한 과오 돌연변이 (TCT→TTT, Ser→Phe; 시료 395, 400, SNU-1047 및 LS174T)이었고, 2개는 동일한 해독틀내 결실 (시료 396 및 HCT 116)이었다. 코돈 41 및 45에서는 GSK-3 β 인산화 부위로 알려져 있으며, 이들 부위에서의 돌연변이는 β -카테닌의 분해를 차단하여 β -카테닌의 축적을 야기한다고 보고되었다 (Saegusa, M. and Okayasu, I. *J. Pathol.* 194:59-67, 2001).

<54> 나머지 1개의 β -카테닌 돌연변이는 코돈 32에서 발견되었다. 코돈 32는 β -카테닌 편재성 (ubiquitination) 및 프로테아좀-의존성 분해에 있어서 매우 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려져 있는데 (Tong, J. H. et al., *Cancer Lett.* 163:125-130, 2001), 코돈 32에서의 돌연변이는 GSK-3 β 키나아제 (GSK-3 β kinase)에 의한 세린 33 접근성 (accessibility)에 영향을 미쳐 이들의 인산화를 억제한다 (Koch, A. et al., *Cancer Res.* 59:269-273, 1999).

<55> 본 발명에서는 결장직장암에서 유래된 5개 β -카테닌 돌연변이 중 3개가, 세포주로부터 유래된 4개 β -카테닌 돌연변이 중 3개가 코돈 45에서 발견되었는데 이들 중 2개 돌연변이가 해독틀내 결실이었다. 코돈 45에서의 해독틀내 결실은 이전에 결장직장암 세포주 및 결장직장 암종에서는 보고된 바 있으나 다른 형태의 암에서는 보고된 바 없으며 (Ilyas, M. et al.,

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:10330-10334, 1997; Muller, O. et al., 22:37-41, 1998), 이로 인해 효소 GSK-3 β 를 표적으로 하는 단백질 부위 내 고도로 보존된 세린 잔기들이 소실된다 (Ilyas, M., et al., 94:10330-10334, 1997). 본 발명에서는 해독틀내 결실을 포함하여 코돈 45에서의 돌연변이가 다른 형태의 암종에서는 흔치 않으나, 결장 직장 암종에서는 일반적으로 발견됨을 재확인하였다.

<56> 본 발명의 β -카테닌 올리고 칩에 의해 검출된 9개의 β -카테닌 돌연변이를 종래의 돌연변이 검사방법으로 비교한 결과, 돌연변이 분석에 폭넓게 사용되고 있는 자동화 직접 염기서열 분석은 본 발명의 β -카테닌 올리고 칩에 의해 검출된 9개의 β -카테닌 돌연변이 중 2개를 정확하게 검출하지 못하였다 (도 2 참조). PCR-SSCP 역시 한 개의 β -카테닌 돌연변이 검출을 놓쳤는데 (도 3 참조), 이러한 위-음성 (false-negative) 결과는 암조직 내 정상 조직의 함유로 인한 과도한 정상 DNA 또는 상기 두 방법의 낮은 민감성에 기인한 것으로 판단된다.

<57> 본 발명에서는 BAT-26 마커를 이용한 MSI 분석에서 MSI가 근위 결장암과 밀접한 관련이 있다는 기존의 보고를 재확인하였다 ($p < 0.01$) (Mirabelli-Primdahl, L. et al., *Cancer Res.* 59:3346-51, 1999; Traverso, G. et al., *Lancet.* 359:403-404, 2002). MSI는 34종의 근위 결장암 조직 중 10종 (29%)에서 검출된 반면, 40종의 원위 결장직장 암종에서는 오직 2종 (5%)에서만 검출되었다. MSI 및 β -카테닌 돌연변이간의 상관관계에 있어서, MSI를 나타내는 12종의 결장직장 암종 중 5종 (42%)에서 β -카테닌 돌연변이가 발견되었지만, MSS (microsatellite stability)를 나타내는 62종의 결장직장 암종에서는 β -카테닌 돌연변이가 전혀 발견되지 않았다. 또한, MSI를 나타내는 5종의 결장

암종에서 발견된 β -카테닌 돌연변이는 모두 근위 결장암 조직에서 발견되었다. 이러한 결과는 MSI가 β -카테닌 돌연변이에 상당히 관여하고 있으며, 근위 결장암과 매우 밀접하게 관련되어 있음을 입증하는 것이다.

<58> 결장직장암에 있어서 β -카테닌 돌연변이가 APC 돌연변이를 특이적으로 대체할 수 있으며, β -카테닌 돌연변이가 정상 APC를 갖는 결장직장암의 약 절반을 차지하고 있음은 이미 보고된 바 있다 (Sparks, A. B. et al., *Cancer Res.* 59:998: 1130-1134, 1998). 본 발명에서는, β -카테닌 돌연변이를 나타내는 9종의 시료 중 오직 한 개의 결장직장암 세포주 (SNU-1047)만이 MCR에 APC 돌연변이를 가지는 것으로 확인되었다. 최근에 몇몇 그룹들이 다양한 분자적 마커 (molecular markers), 예를 들면 APC, p53, long DNA, K-ras 등을 이용하여 결장직장암을 진단하려는 노력이 있었고 (Traverso, G. et al., *Lancet.* 359:403-404, 2002; Ahlquist, D. A. et al., *Gastroenterology* 119:1219-1227, 2000; Dong, S. M. et al., *J. Natl. Cancer Inst.* 93:858-865, 2001), MSI를 포함한 5개 마커 중 3개는 배설물 DNA를 대상으로 결장직장암을 진단하기 위하여 사용되었다 (Ahlquist, D. A. et al.,

Gastroenterology 119:1219-1227, 2000; Dong, S. M. et al., *J. Natl. Cancer Inst.* 93:858-865, 2001). 또한, MSI는 결장직장암 중에서 항문으로부터 가장 멀리 떨어져있기 때문에 검출하기가 어려운 근위 결장암을 진단하기 위하여 사용되었다 (Traverso, G. et al., *Lancet*. 359:403-404, 2002). β -카테닌 돌연변이가 근위 결장 내 종양의 위치와 관련이 있다면 β -카테닌은 근위 결장암의 진단 마커로 사용될 수 있을 것이다. 본 발명에서는 근위 결장암 중 29%에서 MSI가 나타났고, β -카테닌 돌연변의 경우 근위 결장암 중 15%에서 검출되었다. 따라서, β -카테닌 돌연변이를 갖는 모든 시료들이 MSI를 나타낸다 할지라도, β -카테닌 돌연변이는 단독으로 또는 MSI와 함께 근위 결장암의 진단을 위해 사용될 수 있다. 실제로, 이러한 시스템은 대상 시료로 배설물 DNA를 사용하는 경우에 특히 유용한 진단 도구로서 자동화된 고도의 통합 시스템 (throughout system)의 형태로 제공될 수 있다. 따라서, 본 발명의 β -카테닌 올리고 칩은 극소량의 오염이 많은 배설물 DNA를 대상으로 결장직장암을 진단하기 위한 도구로 유용하게 사용될 수 있다.

<59> 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.

<60> 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

<61> <실시예 1> β -카테닌 올리고 칩을 이용한 β -카테닌 유전자의 돌연변이 검색

<62> (단계 1) β -카테닌 올리고 칩의 제작

<63> β -카테닌 유전자의 돌연변이 집중코돈 부위인 11개 코돈에서 발생가능한 다양한 돌연변이를 검사할 수 있는 110개 타입의 올리고뉴클레오타이드를 하기 표 1a 내지 1c와

같이 제작하였다 (Metabion, Germany). 서열번호 2 내지 10으로 기재되는 올리고뉴클레오타이드들은 코돈 29에 대한 과오 돌연변이를, 서열번호 11로 기재되는 올리고뉴클레오타이드는 코돈 29에 대한 해독틀내 결실 (3 bp 결실)을 가지고 있다. 서열번호 13 내지 21로 기재되는 올리고뉴클레오타이드들은 코돈 31에 대한 과오 돌연변이를, 서열번호 22로 기재되는 올리고뉴클레오타이드는 코돈 31에 대한 해독틀내 결실을 가지고 있다. 서열번호 24 내지 32로 기재되는 올리고뉴클레오타이드들은 코돈 32에 대한 과오 돌연변이를, 서열번호 33으로 기재되는 올리고뉴클레오타이드는 코돈 32에 대한 해독틀내 결실을 가지고 있다. 서열번호 35 내지 43으로 기재되는 올리고뉴클레오타이드들은 코돈 33에 대한 과오 돌연변이를, 서열번호 44로 기재되는 올리고뉴클레오타이드는 코돈 33에 대한 해독틀내 결실을 가지고 있다. 서열번호 46 내지 54로 기재되는 올리고뉴클레오타이드들은 코돈 34에 대한 과오 돌연변이를, 서열번호 55로 기재되는 올리고뉴클레오타이드는 코돈 34에 대한 해독틀내 결실을 가지고 있다. 서열번호 57 내지 65로 기재되는 올리고뉴클레오타이드들은 코돈 35에 대한 과오 돌연변이를, 서열번호 66으로 기재되는 올리고뉴클레오타이드는 코돈 35에 대한 해독틀내 결실을 가지고 있다. 서열번호 68 내지 76으로 기재되는 올리고뉴클레오타이드들은 코돈 37에 대한 과오 돌연변이를, 서열번호 77로 기재되는 올리고뉴클레오타이드는 코돈 37에 대한 해독틀내 결실을 가지고 있다. 서열번호 79 내지 87로 기재되는 올리고뉴클레오타이드들은 코돈 38에 대한 과오 돌연변이를, 서열번호 88로 기재되는 올리고뉴클레오타이드는 코돈 38에 대한 해독틀내 결실을 가지고 있다. 서열번호 90 내지 98로 기재되는 올리고뉴클레오타이드들은 코돈 41에 대한 과오 돌연변이를, 서열번호 99로 기재되는 올리고뉴클레오타이드는 코돈 41에 대한 해독틀내 결실을 가지고 있다. 서열번호 101 내지 109로 기재되는 올리고뉴클레오타이드들은 코돈 45에 대한 과오 돌연변이

를, 서열번호 110으로 기재되는 올리고뉴클레오티드는 코돈 45에 대한 해독틀내 결실을 가지고 있다. 서열번호 112 내지 120으로 기재되는 올리고뉴클레오티드들은 코돈 48에 대한 과오 돌연변이를, 서열번호 121로 기재되는 올리고뉴클레오티드는 코돈 48에 대한 해독틀내 결실을 가지고 있다. 각 코돈의 정상형 (wild type)을 검색하기 위한 11개 올리고뉴클레오티드는 각각 서열번호 1, 12, 23, 34, 45, 56, 67, 78, 89, 100 및 111로 기재되는 염기서열을 갖는다.

<64> 상기와 같이 고안된 121개 올리고뉴클레오티드 모두는 12개의 탄소 스페이서 (carbon spacers)와 5'-말단이 변형된 아미노산 잔기를 가지며, HPLC로 분리·정제되었다.

<65>

【표 1a】

서열번호	올리고뉴클레오타이드	엑손	코돈	염기서열
1	29W	3	29	5'-CAGCAACAGTCTTACCTGGAC-3'
2	29M1			5'- GCAGCAACAG <u>ACT</u> TACCTGGA-3'
3	29M2			5'- GCAGCAACAG <u>GCT</u> TACCTGGA-3'
4	29M3			5'- GCAGCAACAG <u>CCT</u> TACCTGGA-3'
5	29M4			5'-CAGCAACAGTAT TACCTGGAC-3'
6	29M5			5'-CAGCAACAGT <u>GT</u> TACCTGGAC-3'
7	29M6			5'-CAGCAACAGT <u>TT</u> TACCTGGAC-3'
8	29M7			5'-AGCAACAGT <u>CA</u> TACCTGGACT-3'
9	29M8			5'-AGCAACAGT <u>CG</u> TACCTGGACT-3'
10	29M9			5'-AGCAACAGT <u>CC</u> TACCTGGACT-3'
11	29D			5'-GGCAGCAACAGTACCTGGACT-3'
12	31W		31	5'-CAGTCTTACCTGGACTCTGGA-3'
13	31M1			5'-ACAGTCTTACAT <u>G</u> GACTCTGG-3'
14	31M2			5'-ACAGTCTTACT <u>TG</u> GACTCTGG-3'
15	31M3			5'-ACAGTCTTAC <u>G</u> TG GACTCTGG-3'
16	31M4			5'-CAGTCTTAC <u>CAG</u> GACTCTGGA-3'
17	31M5			5'-CAGTCTTAC <u>CGG</u> GACTCTGGA-3'
18	31M6			5'-CAGTCTTAC <u>CCG</u> GACTCTGGA-3'
19	31M7			5'-AGTCTTAC <u>CTA</u> GACTCTGGAA-3'
20	31M8			5'-AGTCTTAC <u>CTC</u> GACTCTGGAA-3'
21	31M9			5'-AGTCTTAC <u>CTT</u> GACTCTGGAA-3'
22	31D			5'-AACAGTCTTACGACTCTGGAA-3'
23	32W		32	5'-TCTTACCTGGACTCTGGAATC-3'
24	32M1			5'-GTCTTACCTG <u>CAC</u> TCTGGAAT-3'
25	32M2			5'-GTCTTACCTG <u>TAC</u> TCTGGAAT-3'
26	32M3			5'-GTCTTACCTG <u>AAC</u> TCTGGAAT-3'
27	32M4	3	32	5'-TCTTACCTG <u>GCC</u> TCTGGAATC-3'
28	32M5			5'-TCTTACCTG <u>GTC</u> TCTGGAATC-3'
29	32M6			5'-TCTTACCTG <u>GGC</u> TCTGGAATC-3'
30	32M7			5'-CTTACCTGG <u>GAG</u> TCTGGAATCC-3'
31	32M8			5'-CTTACCTGG <u>GAT</u> TCTGGAATCC-3'
32	32M9			5'-CTTACCTGG <u>GAA</u> TCTGGAATCC-3'
33	32D			5'-AGTCTTACCTGTCTGGAATCC-3'
34	33W		33	5'-TACCTGGACTCTGGAATCCAT-3'
35	33M1			5'-TTACCTGGAC <u>ACT</u> GGAATCCA-3'
36	33M2			5'-TTACCTGGAC <u>GCT</u> GGAATCCA-3'
37	33M3			5'-TTACCTGGAC <u>CCT</u> GGAATCCA-3'
38	33M4			5'-TACCTGGACT <u>GT</u> GGAATCCAT-3'
39	33M5			5'-TACCTGGACT <u>TAT</u> GGAATCCAT-3'
40	33M6			5'-TACCTGGACT <u>TTT</u> GGAATCCAT-3'

【표 1b】

서열번호	올리고뉴클레오타이드	엑손	코돈	염기서열
55	34D	3	34	5'-CCTGGACTCTATCCATTCTGG-3'
41	33M7			5'-ACCTGGACT <u>TCA</u> GGAATCCATT-3'
42	33M8			5'-ACCTGGACT <u>TCG</u> GGAATCCATT-3'
43	33M9			5'-ACCTGGACT <u>TCC</u> GGAATCCATT-3'
44	33D			5'-TTACCTGGACGGAATCCATTCT-3'
45	34W		34	5'-CTGGACTCTGGAATCCATTCT-3'
46	34M1			5'-CCTGGACTCT <u>TGA</u> ATCCATTCT-3'
47	34M2			5'-CCTGGACTCT <u>AGA</u> ATCCATTCT-3'
48	34M3			5'-CCTGGACTCT <u>CGA</u> ATCCATTCT-3'
49	34M4			5'-CTGGACTCT <u>GTA</u> ATCCATTCT-3'
50	34M5			5'-CTGGACTCT <u>GCA</u> ATCCATTCT-3'
51	34M6			5'-CTGGACTCT <u>GAA</u> ATCCATTCT-3'
52	34M7			5'-TGGACTCT <u>GGT</u> ATCCATTCTG-3'
53	34M8			5'-TGGACTCT <u>GGG</u> ATCCATTCTG-3'
54	34M9			5'-TGGACTCT <u>GGC</u> ATCCATTCTG-3'
56	35W		35	5'-GACTCTGGAATCCATTCTGGT-3'
57	35M1			5'-GGACTCTGGAG <u>CTC</u> CATTCTGG-3'
58	35M2			5'-GGACTCTGGAC <u>CTC</u> CATTCTGG-3'
59	35M3			5'-GGACTCTGGAT <u>CTC</u> CATTCTGG-3'
60	35M4			5'-GACTCTGGA <u>ACC</u> CATTCTGGT-3'
61	35M5			5'-GACTCTGGA <u>AGC</u> CATTCTGGT-3'
62	35M6			5'-GACTCTGGA <u>AAC</u> CATTCTGGT-3'
63	35M7			5'-ACTCTGGA <u>ATG</u> CATTCTGGTG-3'
64	35M8			5'-ACTCTGGA <u>ATA</u> CATTCTGGTG-3'
65	35M9			5'-ACTCTGGA <u>ATT</u> CATTCTGGTG-3'
66	35D			5'-GGACTCTGGACATTCTGGTGC-3'
67	37W		37	5'-GGAATCCATTCTGGTGCCACT-3'
68	37M1			5'-TGGAATCCAT <u>ACT</u> GGTGCCAC-3'
69	37M2			5'-TGGAATCCAT <u>CCT</u> GGTGCCAC-3'
70	37M3			5'-TGGAATCCAT <u>GCT</u> GGTGCCAC-3'
71	37M4			5'-GGAATCCAT <u>TAT</u> GGTGCCACT-3'
72	37M5			5'-GGAATCCAT <u>TGT</u> GGTGCCACT-3'
73	37M6			5'-GGAATCCAT <u>TTT</u> GGTGCCACT-3'
74	37M7			5'-GAATCCAT <u>TCA</u> GGTGCCACTA-3'
75	37M8			5'-GAATCCAT <u>TCG</u> GGTGCCACTA-3'
76	37M9			5'-GAATCCAT <u>TCC</u> GGTGCCACTA-3'
77	37D			5'-TGGAATCCATGGTGCCACTAC-3'
78	38W		38	5'-ATCCATTCTGGTGCCACTACC-3'
79	38M1			5'-AATCCATTCT <u>AGT</u> GCCACTAC-3'
80	38M2			5'-AATCCATTCT <u>CGT</u> GCCACTAC-3'
81	38M3			5'-AATCCATTCT <u>TGT</u> GCCACTAC-3'
82	38M4			5'-ATCCATTCT <u>GAT</u> GCCACTACC-3'



【표 1c】

서열번호	올리고뉴클레오타이드	엑손	코돈	염기서열
83	38M5	3	38	5'-ATCCATTCT <u>GCT</u> GCCACTACC-3'
84	38M6			5'-ATCCATTCT <u>GTT</u> GCCACTACC-3'
85	38M7			5'-TCCATTCT <u>GGA</u> GCCACTACCA-3'
86	38M8			5'-TCCATTCT <u>GGG</u> GCCACTACCA-3'
87	38M9			5'-TCCATTCT <u>GGC</u> GCCACTACCA-3'
88	38D			5'-AATCCATTCTGCCACTACCAC-3'
89	41W		41	5'-GGTGCCACTACCACAGCTCCT-3'
90	41M1			5'-TGGTGCCACT <u>TCC</u> ACAGCTCC-3'
91	41M2			5'-TGGTGCCACT <u>GCC</u> ACAGCTCC-3'
92	41M3			5'-TGGTGCCACT <u>CCC</u> ACAGCTCC-3'
93	41M4			5'-GGTGCCACT <u>AGC</u> ACAGCTCCT-3'
94	41M5			5'-GGTGCCACT <u>ATC</u> ACAGCTCCT-3'
95	41M6			5'-GGTGCCACT <u>AAC</u> ACAGCTCCT-3'
96	41M7			5'-GTGCCACT <u>ACA</u> ACAGCTCCTT-3'
97	41M8			5'-GTGCCACT <u>ACT</u> ACAGCTCCTT-3'
98	41M9			5'-GTGCCACT <u>ACG</u> ACAGCTCCTT-3'
99	41D			5'-TGGTGCCACTACAGCTCCTTC-3'
100	45W		45	5'-ACAGCTCCTTCTCTGAGTGGT-3'
101	45M1			5'-CACAGCTCCT <u>ACT</u> CTGAGTGG-3'
102	45M2			5'-CACAGCTCCT <u>GCT</u> CTGAGTGG-3'
103	45M3			5'-CACAGCTCCT <u>CCT</u> CTGAGTGG-3'
104	45M4			5'-ACAGCTCCT <u>TGT</u> CTGAGTGGT-3'
105	45M5			5'-ACAGCTCCT <u>TAT</u> CTGAGTGGT-3'
106	45M6			5'-ACAGCTCCT <u>TTT</u> CTGAGTGGT-3'
107	45M7			5'-CAGCTCCT <u>TCA</u> CTGAGTGGTA-3'
108	45M8			5'-CAGCTCCT <u>TCG</u> CTGAGTGGTA-3'
109	45M9			5'-CAGCTCCT <u>TCC</u> CTGAGTGGTA-3'
110	45D			5'-CCACAGCTCCTCTGAGTGGTA-3'
111	48W	3	48	5'-TCTCTGAGTGGTAAAGGCAAT-3'
112	48M1			5'-TTCTCTGAGT <u>AGT</u> AAAGGCAA-3'
113	48M2			5'-TTCTCTGAGT <u>TGT</u> AAAGGCAA-3'
114	48M3			5'-TTCTCTGAGT <u>CGT</u> AAAGGCAA-3'
115	48M4			5'-TCTCTGAGT <u>GAT</u> AAAGGCAAT-3'
116	48M5			5'-TCTCTGAGT <u>GCT</u> AAAGGCAAT-3'
117	48M6			5'-TCTCTGAGT <u>GTT</u> AAAGGCAAT-3'
118	48M7			5'-CTCTGAGT <u>GGA</u> AAAGGCAATC-3'
119	48M8			5'-CTCTGAGT <u>GGC</u> AAAGGCAATC-3'
120	48M9			5'-CTCTGAGT <u>GGG</u> AAAGGCAATC-3'
121	48D			5'-TTCTCTGAGTAAAGGCAATCC-3'

<68> 상기와 같이 제작된 올리고뉴클레오타이드 각각을 미세 집적용액 (micro spotting solution, TeleChem International Inc, Sunnyvale, CA)과 1:1의 비율로 혼합한 후 96



웰 플레이트에 40 μl 씩 분주하였다. 이때, 코돈 37, 41 및 45에 대한 과오 돌연변이 또는 해독틀내 결실을 가지고 있는 올리고뉴클레오타이드의 농도는 20 $\text{pmol}/\mu\text{l}$ 가 되도록 하였고 나머지 코돈에 대한 올리고뉴클레오타이드의 농도는 40 $\text{pmol}/\mu\text{l}$ 가 되도록 하였다. 상기 플레이트를 미세배열기 (microarrayer; Microsys 5100 Cartesian사) 내에 장착하여 미세배열기에 의해 알데히드 코팅된 슬라이드 글래스 (aldehyde-coated glass slide, CEL associates사) 위에 직경 130 μm 의 스폿 크기로 300 μm 간격을 두고 행과 열로 배열시켰다. β -카테닌 유전자에 발생가능한 돌연변이를 갖는 각각의 올리고뉴클레오타이드들이 배열된 상기 슬라이드 글래스를 500 ml 비이커를 사용하여 0.2% SDS로 2번 세척한 후 다시 증류수로 1번 세척하였다. 상기 슬라이드 글래스를 95 $^{\circ}\text{C}$ 의 끓는 물에 담가 변성 (denaturation)시킨 후 0.09 M 농도의 붕소수소화 나트륨 (Sodium borohydride) 용액에 5분 동안 담가 올리고뉴클레오타이드가 슬라이드 글래스에 알맞게 결합하도록 하였다. 상기 슬라이드 글래스를 0.2% SDS로 2번, 증류수로 2번 세척한 후 원심분리기를 통해 물기를 제거하여 건조시켰다.

<69> (단계 2) 시료 DNA의 준비

<70> 74종의 결장직장암 표본을 서울대학교 병원으로부터 입수하였고, 31종의 결장직장암 세포주는 한국세포주은행 (Korean Cell Line Bank; KCLB)으로부터 입수하였다. 74종의 결장직장암 표본 중에서 34종은 근위 결장 (맹장부터 비장만곡까지) 부위로부터, 40종은 원위 결장직장 (비장만곡부터 직장까지) 부위로부터 유래되었다. 31종의 결장직장암 세포주 중에서 7종은 근위 결장 부위로부터 유래되었고, 6종은 원위 결장직장 부위로부터 유래되었다. 나머지 18종의 결장직장암 세포주는

유래된 정확한 부위를 확인할 수 없었다. β -카테닌 돌연변이의 양성 대조군으로 위암 세포주 SNU-638 및 SNU-719를 사용하였다 (Woo, D. K. et al., *Int. J. Cancer* 95:108-113, 2001). SNU-638은 코돈 41에 쓰레오닌이 알라닌으로 변형된 β -카테닌 돌연변이 (ACC→GCC, Thr→Ala)를 가지며, SNU-719는 코돈 34에 글리신이 발린으로 변형된 돌연변이 (GGA→GTA, Gly→Val)를 갖는다.

<71> 계놈 DNA는 냉동 표본으로부터 TRI 시약 (TRI reagent, Molecular Research Center, Cincinnati, OH, USA) 또는 전자동 자성 비드-기본 시스템 (automatic magnetic bead-based system, KingFisher, ThermoLabsystems, Finland)을 이용하여 추출하였다. 형광염료가 부착된 시료 DNA를 제조하기 위하여 상기 DNA를 주형으로 하고 서열번호 122 내지 123으로 기재되는 1개쌍의 시발체 (Metabion, Germany)를 이용하여 PCR을 수행하였다. 하기 표 2에 나타난 바와 같이, 엑손 3에 대한 PCR 시발체는 미라벨리 등에 의해 보고된 바에 따라 제작하였고 (Mirabelli-Primdahl, L. et al., *Cancer Res.* 59:3346-51, 1999), β -카테닌 유전자 내 넓은 부위의 결실 (interstitial large deletion)에 대한 시발체는 우다츠 등에 의해 보고된 바에 따라 제작하였고 (Udatsu, Y. et al., *Pediatr. Surg. Int.* 17:508-512, 2001) 서열번호 124 및 125로 기재되는 염기 서열을 갖는다.

<72>

【표 2】

서열번호	시발체	증폭 부위	증폭되는 크기	염기서열
122	Exon-3F	엑손 3번	218 bp	5'-GATTTGATGGAGTTGGACATGG-3'
123	Exon-3R			5'-TGTTCCTTGAGTGAAGGACTGAG-3'
124	Long-3F	엑손 2번 일 부 ~ 엑손 4번 일부	1115 bp	5'-AAAATCCAGCGTGGACAATGG-3'
125	Long-3R			5'-TGTGGCAAGTTCTGCATCATC-3'

<73> 구체적으로, 결장직장암 표본 또는 세포주로부터 추출한 게놈 DNA 100 ng, 각 시발체 10 pmol, 각 dNTP 40 μ M, 형광염료 (Fluorescent dye)가 부착된 Cy5-dCTP (NEN사) 혹은 Cy3-dCTP (Amersham사) 20 μ M을 첨가하여 PCR 반응용액의 총 부피를 25 μ l로 맞추었다. 상기 PCR 반응용액을 94℃에서 5분 동안 변성시킨 후 94℃에서 30초, 56℃에서 30초, 72℃에서 1분 동안의 반응을 35회 반복하고 마지막으로 72℃에서 7분 동안 증폭하였다. 이로부터 증폭된 Cy5 혹은 Cy3가 표지된 PCR 산물을 DNA 정제용 키트 (purification kit, Qiagen사)를 이용하여 정제한 후 0.25 U DNase I (Takara사)을 1 μ l 처리하여 25℃에서 10분 동안 반응시켜 분해하였고 효소는 85℃에서 10분간 처리하여 불활성화하였다. 반응 후 잔존하는 DNase I을 상기 정제 과정을 다시 거쳐 제거하고 Cy5 혹은 Cy3 표지 시료 DNA를 회수하였다.

<74> (단계 3) 혼성화 반응 및 분석

<75> 단계 2)에서 준비된 Cy5 혹은 Cy3 표지 시료 DNA를 5×혼성화 용액 (hybridization solution, TeleChem사)과 혼합하여 총량이 2~4 μ l가 되도록 한 후 단계 1)에서 준비된 슬라이드 글래스 위에 약 2 μ l를 적가하고 커버 글래스 (cover slide)로 덮어두었다.

수증기로 포화된 튜브 (saturated vapor tube) 안에 상기 슬라이드 글래스를 넣은 채로 약 3시간 동안 56℃의 혼성화 배양기 (hybridization incubator)에 넣고 혼성화 반응을 수행하였다. 혼성화 반응이 끝난 슬라이드 글래스를 0.2% SDS 및 2×SSC 혼합용액으로 15 내지 30분간, 증류수로 5분간 세척한 후 원심분리기를 이용하여 물기를 제거하여 건조시켰다. 상기 슬라이드 글래스를 스캐너 (ScanArray Lite, Packard Instrument사)와 응용 프로그램을 사용하여 이미지 분석을 수행하였다. β -카테닌 올리고 칩을 판독기 (ScanArray Lite, Packard Instrument Co, Meriden, CT)를 이용하여 스캔하였고, 이메진 (Imagene, Biodiscovery, version 4.2) 및 정량적 미세배열 분석 소프트웨어 (quantitative microarray analysis software, QuantArray, version 2.0)를 이용하여 분석하였다.

<76> 11개 코돈 각각에 대한 정상형 신호 (W)를 다른 신호와 비교하였고, 신호 표준화 (signal normalization)에 의해 동일하게 조절하였다. 각 코돈에서 검출된 나머지 110개 신호들 또한 정상형 신호와 동일한 방법으로 조절하였다. 신호 표준화 후, 모든 신호들을 김 등의 방법에 따라 재분석하였다 (Kim, I. J. et al., *Clin. Cancer Res.* 8:457-463, 2002). 배경 신호들 (background signals)의 평균 (BA) 및 표준편차 (BSD)를 계산하였고, (BA+2.58BSD)에 의해 역치값 (cutoff level)을 결정하였다. (BA+2.58BSD)는 99% 신뢰구간의 상한선을 의미하는 것으로, 이 값을 넘어서는 검출 신호를 특이적인 신호로 간주하였다. 모든 결과 분석은 마이크로소프트 엑셀 프로그램 (Microsoft Excel Program)을 사용하여 평균 및 표준편차를 계산하였으며, 시그마플롯 (SigmaPlot, SPSS Inc., San Rafael, CA)을 사용하여 그래프로 도시화하였다. 상기 돌연변이 분석 결과를 하기 표 3에 나타내었다.

<77> 【표 3】

시료		β-카테닌 돌연변이			MSI	APC 돌연변이
시료명	타입	위치	코돈	돌연변이		
207	종양	상행 ^c	32	GAC→AAC	+ ^f	- ^g
395	종양	상행	45	TCT→TTT	+	-
396	종양	상행	45	해독틀내 결실	+	-
400	종양	상행	45	TCT→TTT	+	-
435	종양	상행	41	ACC→GCC	+	-
SNU-407 ^a	세포주	횡행 ^d	41	ACC→GCC	+	-
SNU-1047 ^a	세포주	횡행	45	TCT→TTT	+	4107delC
LS174T ^b	세포주	결장 ^e	45	TCT→TTT	+	-
HCT116 ^b	세포주	결장	45	해독틀내 결실	+	-

^a Oh, J. H. et al., *Int. J. Cancer* 81:902-910, 1999
^b Ilyas, M. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:10330-10334, 1997
^c 상행 결장
^d 횡행 결장
^e 이들 세포주의 정확한 기원은 알려지지 않았으나 인간 결장 선암종에서 유래되었음은 확인함.
^f BAT-26 마커를 이용한 MSI 분석
^g MCR에서는 어떠한 APC 돌연변이도 발견되지 않음.

<78> 표 3에 나타난 바와 같이, 74종의 결장직장암 조직 중 5종의 시료 (조직 시료 207, 395, 396, 400 및 435) (7%)에서 β-카테닌 유전자의 돌연변이가 발견되었다. 이들 5개 β-카테닌 돌연변이가 발견된 조직 시료는 모두 34종의 근위 결장암 유래 조직이었으며 (15%, 5/34), 40종의 원위 결장직장암으로부터는 전혀 검출되지 않았다 (0%, 0/40). 5개 β-카테닌 돌연변이는 34종의 근위 결장암 중에서 25종의 우향 (right-sided) 결장암 조직에서 발견된 것으로, 9종의 횡행 (transverse) 결장암 조직에서는 어떠한 돌연변이도 발견되지 않았다. 이로부터 β-카테닌 돌연변이가 근위 결장 내 종양들과 연관되어 있음을 알 수 있다 (p=0.017).

<79> 31종의 결장직장암 세포주 중에는 SNU-407, SNU-1047, LS174T 및 HCT 116 세포주에서 4개의 β -카테닌 돌연변이가 발견되었다. 이들 4개 β -카테닌 돌연변이 중 2개는 횡행 결장으로부터 유래된 세포주, SNU 407 및 SNU 1047에서 발견되었다. β -카테닌 돌연변이를 갖는 다른 2개 세포주 (LS174T 및 HCT 116)의 기원은 밝혀지지 않았다.

<80> 총 9개의 돌연변이가 74종의 결장직장암 조직 및 31종의 결장직장암 세포주에서 발견되었다. 이들 9개 돌연변이들 중 8개가 GSK-3 β 인산화 부위에서 발견되었다. 모든 점 돌연변이들은 아미노산이 치환된 것으로 코돈 32, 41 및 45에서 야기되었다. 이중 6개 돌연변이는 코돈 45에 집중되어 있었는데, 이들 코돈 45에서의 6개 점 돌연변이 중에서 4개는 동일한 과오 돌연변이 (TCT \rightarrow TTT, Ser \rightarrow Phe, 시료 395, 400, SNU-1047 및 LS174T)이었고 2개는 동일한 해독틀내 결실 (시료 396 및 HCT116)이었다. 본 발명의 β -카테닌 올리고 칩을 이용한 검색방법에서는 β -카테닌 유전자 내 넓은 부위의 결실 (interstitial large deletion)은 검출되지 않았다.

<81> 조직 400의 경우 정상형 신호와 함께 부가적인 신호가 검출되는데, 이는 코돈 45에서의 과오 돌연변이 (TCT \rightarrow TTT, Ser \rightarrow Phe)를 나타내는 것이다 (도 1). β -카테닌 돌연변이를 갖는 9개 시료 중 8개가 각 코돈에서의 정상형 신호와 돌연변이 신호를 함께 나타내었는데, 이는 이형접합 돌연변이 (heterozygous mutations)의 존재를 나타내는 것이다. 반면, 세포주 LS174T는 코돈 45에서 정상형 신호 없이 오직 돌연변이 신호만을 나타내었는데, 이는 세포주 LS174T가 동형접합 (homozygous) β -카테닌 돌연변이를 가짐을 의미하는 것이다.

<82> β -카테닌 돌연변이를 갖는 9개 시료 모두가 MCR (mutation cluster region, 코돈 1263 내지 1513) 내 APC 돌연변이를 갖는지 조사한 결과, 이들 중 단 하나의 세포주

(SNU-1047)만이 코돈 1369에서 APC 절단 돌연변이 (4107delC)를 가지고 있었고, β -카테닌 돌연변이를 갖지 않는다고 보고된 세포주 LS174T가 본 발명에서는 β -카테닌 돌연변이 (코돈 45, TCT→TTT, Ser→Phe)를 갖는 것으로 확인되었다 (Ilyas, M. et al., 94:10330-10334, 1997).

<83> <실시예 2> β -카테닌 올리고 칩에 의해 검색된 돌연변이의 확인

<84> 본 발명의 β -카테닌 올리고 칩에 의해 검색된 돌연변이를 확인하기 위하여 β -카테닌 돌연변이가 검출된 9종의 시료를 대상으로 PCR-SSCP, DHPLC, PTT, 클로닝 및 염기서열 분석을 수행하였다.

<85> PCR-SSCP 및 DHPLC 분석은 김 등에 의해 보고된 방법에 따라 수행하였다 (Kim, I. J. et al., *Int. J. Cancer* 86:529-532, 2000; Wagner, T. et al., *Genomics* 62:369-376, 1999). DHPLC 분석은 WAVE (Transgenomic, Omaha, NE)를 사용하여 수행하였고, 운행조건은 WAVEMAKER 소프트웨어를 이용하여 최적화하였다. 단백질 절단 테스트 (protein truncation test, PTT)는 APC 유전자의 돌연변이 집중 부위 (MCR, 코돈 1263 내지 1513)의 돌연변이를 검출하기 위해 원 등에 의해 보고된 방법에 따라 수행하였다 (Won, Y. J. et al., *J. Hum. Genet.* 44:103-108, 1999). 클로닝은 증폭된 PCR 산물을 PCR-TOPO 벡터 (Invitrogen, Carlsbad, CA)에 삽입하였고, TA 클로닝 벡터 시스템 (Invitrogen, Carlsbad, CA)을 이용하여 서브클로닝하였다. 양-방향 염기서열 분석 (bi-directional sequencing)은 Taq 디데옥시 종결자 순환 염기서열 분석 키트 (Taq dideoxy terminator cycle sequencing kit)와 ABI 3100 DNA 염기서열 분석기 (Applied Biosystems, Forster City, CA)를 이용하여 수행하였다.



<86> 【표 4】

시료	SSCP	DHPLC	직접 염기서열 분석	클로닝-염기서열 분석	β -카테닌 올 리고 칩
207	+ ^a	+	ND	+	+
395	+	+	+	+	+
396	+	+	+	+	+
400	ND ^b	+	ND	+	+
435	+	+	+	+	+
SNU-407	+	+	+	+	+
SNU-1047	+	+	+	+	+
LI174T	+	+	+	+	+
HCT116	+	+	+	+	+
^a 검출 ^b 비검출					

<87> 본 발명의 β -카테닌 올리고 칩에 의해 검출된 9개의 β -카테닌 돌연변이를 종래의 돌연변이 검사방법으로 비교한 결과, 상기 표 4에 나타난 바와 같이 돌연변이 분석에 폭넓게 사용되고 있는 자동화 직접 염기서열 분석은 본 발명의 β -카테닌 올리고 칩에 의해 검출된 9개의 β -카테닌 돌연변이 중 2개를 정확하게 검출하지 못하였다 (도 2). PCR-SSCP 역시 한 개의 β -카테닌 돌연변이 검출을 놓쳤는데 (도 3), 이러한 위-음성 (false-negative) 결과는 채취된 암 조직 내 정상 조직의 함입으로 인한 과도한 정상 DNA 또는 상기 두 방법의 낮은 민감성에 기인한 것으로 판단된다.

<88> <실시예 3> β -카테닌 돌연변이와 MSI의 상관관계 조사

<89> MSI (Microsatellite Instability) 상태는 근위 결장암과 밀접한 관련이 있으며, 이를 이용한 결장암의 진단 가능성이 보고된 바 있다 (Traverso, G. et al., *Lancet*. 359:403-404, 2002). 이에 MSI 상태를 결정하기 위하여 이전에 보고된 방법에 따라 74 종의 결장직장 암으로부터 분리된 게놈 DNA를 BAT-26 마커를 이용하여 증폭하였다

(Shitoh, K. et al., *Genes Chromosomes Cancer* 30:32-37, 2001; Samowitz, W. S. et al., *Am. J. Pathol.* 158:1517-1524, 2001).

<90> 구체적으로, 암 조직과 정상 조직으로부터 Picoll-Paque 및 Trizol 시약을 이용하여 추출한 DNA 100 ng, 서열번호 126 및 127로 기재되는 10 pmol/ μ l BAT26-F 및 BAT26-R 시발체 각 0.25 μ l, 각 2.5 mM dNTP 0.5 μ l, 10 \times PCR 완충용액 2.5 μ l, [α -³²P]dCTP 0.25 μ l, Taq DNA 중합효소 (5 단위/ μ l) 0.1 μ l를 혼합한 후 PCR 반응용액의 총 부피를 25 μ l로 맞추었다. 상기 PCR 반응용액을 94 $^{\circ}$ C에서 5분 동안 변성시킨 후 94 $^{\circ}$ C에서 30초, 52 $^{\circ}$ C에서 30초, 72 $^{\circ}$ C에서 1분 동안의 반응을 35회 반복하고 마지막으로 72 $^{\circ}$ C에서 7분 동안 증폭하였다. 증폭반응이 끝난 반응용액을 95 $^{\circ}$ C에서 5분간 가열한 후 얼음 수조에 담가 냉각시켰다. 냉각된 반응용액 35 μ l를 4.5% 우레아를 함유하는 40% 폴리아크릴아미드 (29:1) 겔에 전기영동한 후 겔을 건조시킨 다음 X-선 필름에 감광시켜 분석하였다.

<91> β -카테닌 돌연변이, MSI 및 종양 위치 사이의 상관관계를 결정하기 위하여 χ^2 또는 피셔의 정확도 테스트 (Fisher's exact test)를 이용하여 통계학적 분석 (Statistical Methods)을 수행하였다. STATISTICA 소프트웨어 (StatSoft Inc., Tulsa, OK)를 이용하여 $\alpha=0.05$ 를 유의성 있는 수준으로 정하였다.

<92> BAT-26 마커를 사용한 결과, 74종의 결장직장암 조직 중 12개 (16%)에서 MSI를 나타내었다. 34종의 근위 결장암 중 10개 (29%)가 MSI를 갖는 것으로 확인되었고, 40종의 원위 결장직장암 중 2개 (5%)만이 MSI를 나타내는 것으로 조사되었다. MSI는 통계학적으로 근위 부위와 밀접하게 관련되어 있었다 ($p<0.01$). 5개 β -카테닌 돌연변이 모두 MSI를 갖는 12종의 결장직장암에서 발견되었고 (42%, 5/12), MSS (microsatellite

stability)를 갖는 62종의 결장직장암에서는 전혀 발견되지 않았다. 이러한 결과로부터, β -카테닌 돌연변이는 MSS보다는 MSI를 갖는 결장직장 암종들에서 보다 일반적인 것임을 확인할 수 있었다 ($p < 0.001$).

【발명의 효과】

<93> 상기에서 살펴본 바와 같이, 본 발명의 β -카테닌 올리고 칩은 기존의 돌연변이 검색 방법과는 달리 작은 고형 기관 표면에 집적된 올리고뉴클레오티드를 이용하여 돌연변이를 검색하는 방법으로 시간과 비용, 정확성 면에서 뛰어난 효과를 나타낸다. 따라서, 본 발명의 β -카테닌 올리고 칩은 β -카테닌 유전자의 돌연변이 검색 및 β -카테닌 유전자와 관련된 신호 전달 체계의 연구나 암 기전 연구에 유용하게 사용될 수 있을 뿐만 아니라 β -카테닌 유전자와 같이 돌연변이 집중코돈 부위를 가진 유전자에 적용이 가능하며 그 응용범위가 매우 넓다.

【특허청구범위】**【청구항 1】**

β -카테닌 유전자의 돌연변이 집중코돈 부위인 코돈 29, 31, 32, 33, 34, 35, 37, 38, 41, 45 및 48 위치에서 발생하는 돌연변이를 검색할 수 있는 올리고뉴클레오타이드들을 고품 기판의 표면에 고정시킨, β -카테닌 유전자의 돌연변이를 검색할 수 있는 β -카테닌 올리고뉴클레오타이드 마이크로칩.

【청구항 2】

제 1항에 있어서,

β -카테닌 유전자의 돌연변이 집중코돈 부위인 코돈 29, 31, 32, 33, 34, 35, 37, 38, 41, 45 및 48 각각에 대하여 9가지 과오 돌연변이를 검색하기 위한 올리고뉴클레오타이드, 해독틀내 결실을 검색하기 위한 1가지 올리고뉴클레오타이드 및 정상타입의 염기서열을 검색하기 위한 정상형 (wild type) 올리고뉴클레오타이드가 고정되어 있는 것을 특징으로 하는 β -카테닌 올리고뉴클레오타이드 마이크로칩.

【청구항 3】

제 2항에 있어서,

코돈 29에 대한 서열번호 1로 기재되는 정상형 올리고뉴클레오타이드, 과오 돌연변이 검출을 위한 서열번호 2 내지 10으로 기재되는 올리고뉴클레오타이드 및 해독틀내 결실 검출을 위한 서열번호 11로 기재되는 올리고뉴클레오타이드; 코돈 31에 대한 서열번호 12로 기재되는 정상형 올리고뉴클레오타이드, 과오 돌연변이 검출을 위한 서열번호 13 내지 21로 기재되는 올리고뉴클레오타이드 및 해독틀내 결실 검출을 위한 서열번호 22로 기재되는 올리고뉴클레오타이드

고뉴클레오티드; 코돈 32에 대한 서열번호 23으로 기재되는 정상형 올리고뉴클레오티드, 과오 돌연변이 검출을 위한 서열번호 24 내지 32로 기재되는 올리고뉴클레오티드 및 해독틀내 결실 검출을 위한 서열번호 33으로 기재되는 올리고뉴클레오티드; 코돈 33에 대한 서열번호 34로 기재되는 정상형 올리고뉴클레오티드, 과오 돌연변이 검출을 위한 서열번호 35 내지 43으로 기재되는 올리고뉴클레오티드 및 해독틀내 결실 검출을 위한 서열번호 44로 기재되는 올리고뉴클레오티드; 코돈 34에 대한 서열번호 45로 기재되는 정상형 올리고뉴클레오티드, 과오 돌연변이 검출을 위한 서열번호 46 내지 54로 기재되는 올리고뉴클레오티드 및 해독틀내 결실 검출을 위한 서열번호 55로 기재되는 올리고뉴클레오티드; 코돈 35에 대한 서열번호 56으로 기재되는 정상형 올리고뉴클레오티드, 과오 돌연변이 검출을 위한 서열번호 57 내지 65로 기재되는 올리고뉴클레오티드 및 해독틀내 결실 검출을 위한 서열번호 66으로 기재되는 올리고뉴클레오티드; 코돈 37에 대한 서열번호 67로 기재되는 정상형 올리고뉴클레오티드, 과오 돌연변이 검출을 위한 서열번호 68 내지 76으로 기재되는 올리고뉴클레오티드 및 해독틀내 결실 검출을 위한 서열번호 77로 기재되는 올리고뉴클레오티드; 코돈 38에 대한 서열번호 78로 기재되는 정상형 올리고뉴클레오티드, 과오 돌연변이 검출을 위한 서열번호 79 내지 87로 기재되는 올리고뉴클레오티드 및 해독틀내 결실 검출을 위한 서열번호 88로 기재되는 올리고뉴클레오티드; 코돈 41에 대한 서열번호 89로 기재되는 정상형 올리고뉴클레오티드, 과오 돌연변이 검출을 위한 서열번호 90 내지 98로 기재되는 올리고뉴클레오티드 및 해독틀내 결실 검출을 위한 서열번호 99로 기재되는 올리고

뉴클레오티드; 코돈 45에 대한 서열번호 100으로 기재되는 정상형 올리고뉴클레오티드, 과오 돌연변이 검출을 위한 서열번호 101 내지 109로 기재되는 올리고뉴클레오티드 및 해독틀내 결실 검출을 위한 서열번호 110으로 기재되는 올리고뉴클레오티드; 및 코돈 48에 대한 서열번호 111로 기재되는 정상형 올리고뉴클레오티드, 과오 돌연변이 검출을 위한 서열번호 112 내지 120으로 기재되는 올리고뉴클레오티드 및 해독틀내 결실 검출을 위한 서열번호 121로 기재되는 올리고뉴클레오티드를 포함하는 것을 특징으로 하는 β -카테닌 올리고뉴클레오티드 마이크로칩.

【청구항 4】

- 1) β -카테닌 유전자의 돌연변이 집중코돈 부위의 돌연변이를 검색할 수 있는 올리고뉴클레오티드를 집적 용액 (spotting solution)에 혼합하여 웰 플레이트에 분주하는 단계;
- 2) 상기 올리고뉴클레오티드를 미세배열기를 이용하여 고형 기판의 표면에 집적하는 단계;
- 3) 상기 기판을 상온에 방치하여 올리고뉴클레오티드를 기판에 고정시킨 후 세척하는 단계;
- 4) 상기 기판을 95℃의 끓는 물에 담가 변성 (denaturation)시킨 후 붕소수소화 나트륨 (sodium borohydride) 용액에 담그는 단계;
- 5) 상기 기판을 세척한 후 건조시키는 단계를 포함하는, 제 1항의 β -카테닌 올리고뉴클레오티드 마이크로칩의 제조방법.

【청구항 5】

제 4항에 있어서,

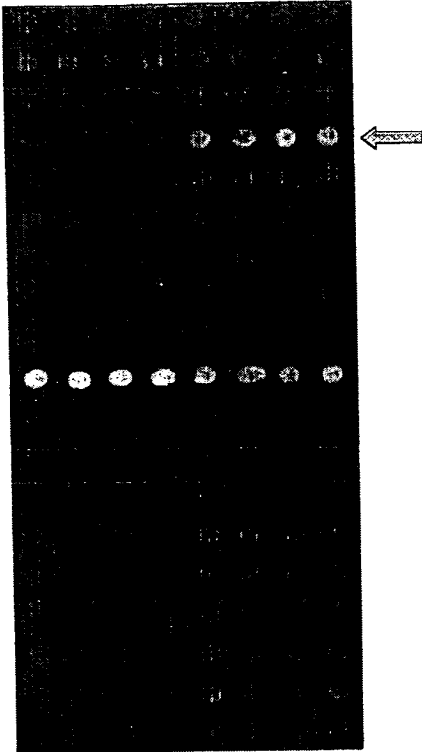
단계 1)의 모든 올리고뉴클레오타이드에는 12개의 탄소 스페이서 (carbon spacer)가 연결되어 있고, 5' 말단에 아미노 변형 (5' amino modification)이 이루어져 있는 것을 특징으로 하는 제조방법.

【청구항 6】

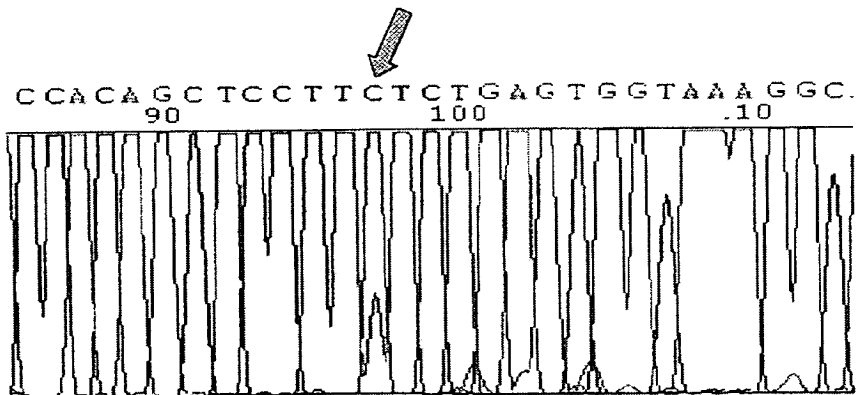
- 1) 대상 환자의 샘플로부터 시료 DNA를 준비하는 단계;
- 2) 상기 시료 DNA와 β -카테닌 올리고뉴클레오타이드 마이크로칩의 혼성화 반응을 수행하는 단계;
- 3) 상기 β -카테닌 올리고 칩을 세척하는 단계;
- 4) 스캐너로 결과를 해석하는 단계; 및
- 5) 돌연변이 유무를 확인하는 단계를 포함하는, 제 1항의 β -카테닌 올리고뉴클레오타이드 마이크로칩을 이용하여 β -카테닌 유전자의 돌연변이를 검사하는 방법.

【도면】

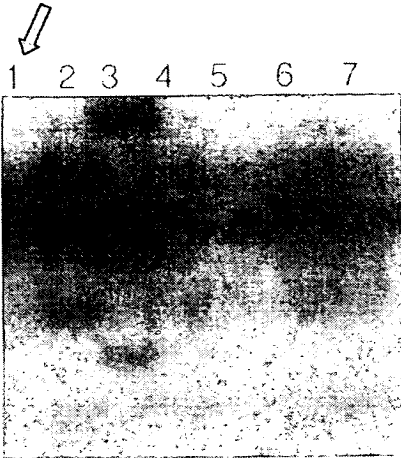
【도 1】



【도 2】



【도 3】



【서열목록】

<110> National Cancer Center <120> BETA-CATENIN OLIGONUCLEOTIDE MICROCHIP AND
METHOD FOR DETECTING BETA-CATENIN MUTATIONS EMPLOYING SAME <130>

FPD/200210-0117 <160> 127 <170> KopatentIn 1.71 <210> 1 <211> 21 <212>

DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> 29W <400> 1 cagcaacagt cttacctgg;
c 21 <210> 2 <211> 21 <212>

DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> 29M1 <400> 2 gcagcaacag
acttacctgg a 21 <210> 3 <211>

21 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> 29M2 <400> 3
gcagcaacag gcttacctgg a 21 <210>

4 <211> 21 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> 29M3 <400>
4 gcagcaacag ccttacctgg a 21 <210>

5 <211> 21 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> 29M4 <400> 5 cagcaacagt attacctgga c

21 <210> 6 <211> 21 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> 29M5 <400> 6 cagcaacagt gttacctgga c

21 <210> 7 <211> 21 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> 29M6 <400> 7 cagcaacagt ttacctgga c

21 <210> 8 <211> 21 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> 29M7 <400> 8 agcaacagtc atacctggac t

21 <210> 9 <211> 21 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> 29M8 <400> 9 agcaacagtc gtacctggac t

21 <210> 10 <211> 21 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> 29M9 <400> 10 agcaacagtc ctacctggac t

21 <210> 11 <211> 21 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> 29D <400> 11 ggcagcaaca gtacctggac t

21 <210> 12 <211> 21 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> 31W <400> 12 cagtcttacc tggactctgg a

21 <210> 13 <211> 21 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> 31M1 <400> 13 acagtcttac atggactctg g

21 <210> 14 <211> 21 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> 31M2 <400> 14 acagtcttac ttggactctg g

21 <210> 15 <211> 21 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

31M3 <400> 15 acagtcttac gtgactctg g
 21 <210> 16 <211> 21 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
 31M4 <400> 16 cagtcttacc aggactctgg a
 21 <210> 17 <211> 21 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
 31M5 <400> 17 cagtcttacc gggactctgg a
 21 <210> 18 <211> 21 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
 31M6 <400> 18 cagtcttacc cggactctgg a
 21 <210> 19 <211> 21 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
 31M7 <400> 19 agtcttacct agactctgga a
 21 <210> 20 <211> 21 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
 31M8 <400> 20 agtcttacct cgactctgga a
 21 <210> 21 <211> 21 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
 31M9 <400> 21 agtcttacct tgactctgga a
 21 <210> 22 <211> 21 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
 31D <400> 22 aacagtctta cgactctgga a
 21 <210> 23 <211> 21 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
 32W <400> 23 tcttacctgg actctggaat c
 21 <210> 24 <211> 21 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
 32M1 <400> 24 gtcttacctg cactctggaa t
 21 <210> 25 <211> 21 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
 32M2 <400> 25 gtcttacctg tactctggaa t

21 <210>	26 <211>	21 <212>	DNA <213>	Artificial Sequence <220> <223>
32M3 <400>	26 gtcttacctg aactctggaa t			
21 <210>	27 <211>	21 <212>	DNA <213>	Artificial Sequence <220> <223>
32M4 <400>	27 tcttacctgg cctctggaat c			
21 <210>	28 <211>	21 <212>	DNA <213>	Artificial Sequence <220> <223>
32M5 <400>	28 tcttacctgg tctctggaat c			
21 <210>	29 <211>	21 <212>	DNA <213>	Artificial Sequence <220> <223>
32M6 <400>	29 tcttacctgg gctctggaat c			
21 <210>	30 <211>	21 <212>	DNA <213>	Artificial Sequence <220> <223>
32M7 <400>	30 cttacctgga gtctggaatc c			
21 <210>	31 <211>	21 <212>	DNA <213>	Artificial Sequence <220> <223>
32M8 <400>	31 cttacctgga ttctggaatc c			
21 <210>	32 <211>	21 <212>	DNA <213>	Artificial Sequence <220> <223>
32M9 <400>	32 cttacctgga atctggaatc c			
21 <210>	33 <211>	21 <212>	DNA <213>	Artificial Sequence <220> <223>
32D <400>	33 agtcttacct gtctggaatc c			
21 <210>	34 <211>	21 <212>	DNA <213>	Artificial Sequence <220> <223>
33W <400>	34 tacctggact ctggaatcca t			
21 <210>	35 <211>	21 <212>	DNA <213>	Artificial Sequence <220> <223>
33M1 <400>	35 ttacctggac actggaatcc a			
21 <210>	36 <211>	21 <212>	DNA <213>	Artificial Sequence <220> <223>

33M2 <400> 36 ttacctggac gctggaatcc a
21 <210> 37 <211> 21 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

33M3 <400> 37 ttacctggac cctggaatcc a
21 <210> 38 <211> 21 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

33M4 <400> 38 tacctggact gtggaatcca t
21 <210> 39 <211> 21 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

33M5 <400> 39 tacctggact atggaatcca t
21 <210> 40 <211> 21 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

33M6 <400> 40 tacctggact ttggaatcca t
21 <210> 41 <211> 21 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

33M7 <400> 41 acctggactc aggaatccat t
21 <210> 42 <211> 21 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

33M8 <400> 42 acctggactc gggaatccat t
21 <210> 43 <211> 21 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

33M9 <400> 43 acctggactc cggaatccat t
21 <210> 44 <211> 21 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

33D <400> 44 ttacctggac ggaatccatt c
21 <210> 45 <211> 21 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

34W <400> 45 ctggactctg gaatccattc t
21 <210> 46 <211> 21 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

34M1 <400> 46 cctggactct tgaatccatt c

21 <210>	47 <211>	21 <212>	DNA <213>	Artificial Sequence <220> <223>
34M2 <400>	47 cctggactct agaatccatt c			
21 <210>	48 <211>	21 <212>	DNA <213>	Artificial Sequence <220> <223>
34M3 <400>	48 cctggactct cgaatccatt c			
21 <210>	49 <211>	21 <212>	DNA <213>	Artificial Sequence <220> <223>
34M4 <400>	49 ctggactctg taatccattc t			
21 <210>	50 <211>	21 <212>	DNA <213>	Artificial Sequence <220> <223>
34M5 <400>	50 ctggactctg caatccattc t			
21 <210>	51 <211>	21 <212>	DNA <213>	Artificial Sequence <220> <223>
34M6 <400>	51 ctggactctg aaatccattc t			
21 <210>	52 <211>	21 <212>	DNA <213>	Artificial Sequence <220> <223>
34M7 <400>	52 tggactctgg tatccattct g			
21 <210>	53 <211>	21 <212>	DNA <213>	Artificial Sequence <220> <223>
34M8 <400>	53 tggactctgg gatccattct g			
21 <210>	54 <211>	21 <212>	DNA <213>	Artificial Sequence <220> <223>
34M9 <400>	54 tggactctgg catccattct g			
21 <210>	55 <211>	21 <212>	DNA <213>	Artificial Sequence <220> <223>
34D <400>	55 cctggactct atccattctg g			
21 <210>	56 <211>	21 <212>	DNA <213>	Artificial Sequence <220> <223>
35W <400>	56 gactctggaa tccattctgg t			
21 <210>	57 <211>	21 <212>	DNA <213>	Artificial Sequence <220> <223>

35M1 <400>	57	ggactctgga	gtccattctg	g	
21 <210>	58 <211>	21 <212>	DNA <213>	Artificial Sequence <220>	<223>
35M2 <400>	58	ggactctgga	ctccattctg	g	
21 <210>	59 <211>	21 <212>	DNA <213>	Artificial Sequence <220>	<223>
35M3 <400>	59	ggactctgga	ttccattctg	g	
21 <210>	60 <211>	21 <212>	DNA <213>	Artificial Sequence <220>	<223>
35M4 <400>	60	gactctggaa	cccattctgg	t	
21 <210>	61 <211>	21 <212>	DNA <213>	Artificial Sequence <220>	<223>
35M5 <400>	61	gactctggaa	gccattctgg	t	
21 <210>	62 <211>	21 <212>	DNA <213>	Artificial Sequence <220>	<223>
35M6 <400>	62	gactctggaa	accattctgg	t	
21 <210>	63 <211>	21 <212>	DNA <213>	Artificial Sequence <220>	<223>
35M7 <400>	63	actctggaat	gcattctggt	g	
21 <210>	64 <211>	21 <212>	DNA <213>	Artificial Sequence <220>	<223>
35M8 <400>	64	actctggaat	acattctggt	g	
21 <210>	65 <211>	21 <212>	DNA <213>	Artificial Sequence <220>	<223>
35M9 <400>	65	actctggaat	tcattctggt	g	
21 <210>	66 <211>	21 <212>	DNA <213>	Artificial Sequence <220>	<223>
35D <400>	66	ggactctgga	cattctggtg	c	
21 <210>	67 <211>	21 <212>	DNA <213>	Artificial Sequence <220>	<223>
37W <400>	67	ggaatccatt	ctggtgccac	t	



21 <210>	68 <211>	21 <212>	DNA <213>	Artificial Sequence <220> <223>
37M1 <400>	68	tggaatccat	actggtgcca c	
21 <210>	69 <211>	21 <212>	DNA <213>	Artificial Sequence <220> <223>
37M2 <400>	69	tggaatccat	cctggtgcca c	
21 <210>	70 <211>	21 <212>	DNA <213>	Artificial Sequence <220> <223>
37M3 <400>	70	tggaatccat	gctggtgcca c	
21 <210>	71 <211>	21 <212>	DNA <213>	Artificial Sequence <220> <223>
37M4 <400>	71	ggaatccatt	atggtgccac t	
21 <210>	72 <211>	21 <212>	DNA <213>	Artificial Sequence <220> <223>
37M5 <400>	72	ggaatccatt	gtggtgccac t	
21 <210>	73 <211>	21 <212>	DNA <213>	Artificial Sequence <220> <223>
37M6 <400>	73	ggaatccatt	ttggtgccac t	
21 <210>	74 <211>	21 <212>	DNA <213>	Artificial Sequence <220> <223>
37M7 <400>	74	gaatccattc	aggtgccact a	
21 <210>	75 <211>	21 <212>	DNA <213>	Artificial Sequence <220> <223>
37M8 <400>	75	gaatccattc	gggtgccact a	
21 <210>	76 <211>	21 <212>	DNA <213>	Artificial Sequence <220> <223>
37M9 <400>	76	gaatccattc	cgggtgccact a	
21 <210>	77 <211>	21 <212>	DNA <213>	Artificial Sequence <220> <223>
37D <400>	77	tggaatccat	ggtgccacta c	
21 <210>	78 <211>	21 <212>	DNA <213>	Artificial Sequence <220> <223>



1020030000987

출력 일자: 2003/4/10

38W <400>	78 atccattctg gtgccactac c			
21 <210>	79 <211>	21 <212>	DNA <213>	Artificial Sequence <220> <223>
38M1 <400>	79 aatccattct agtgccacta c			
21 <210>	80 <211>	21 <212>	DNA <213>	Artificial Sequence <220> <223>
38M2 <400>	80 aatccattct cgtgccacta c			
21 <210>	81 <211>	21 <212>	DNA <213>	Artificial Sequence <220> <223>
38M3 <400>	81 aatccattct tgtgccacta c			
21 <210>	82 <211>	21 <212>	DNA <213>	Artificial Sequence <220> <223>
38M4 <400>	82 atccattctg atgccactac c			
21 <210>	83 <211>	21 <212>	DNA <213>	Artificial Sequence <220> <223>
38M5 <400>	83 atccattctg ctgccactac c			
21 <210>	84 <211>	21 <212>	DNA <213>	Artificial Sequence <220> <223>
38M6 <400>	84 atccattctg ttgccactac c			
21 <210>	85 <211>	21 <212>	DNA <213>	Artificial Sequence <220> <223>
38M7 <400>	85 tccattctgg agccactacc a			
21 <210>	86 <211>	21 <212>	DNA <213>	Artificial Sequence <220> <223>
38M8 <400>	86 tccattctgg ggccactacc a			
21 <210>	87 <211>	21 <212>	DNA <213>	Artificial Sequence <220> <223>
38M9 <400>	87 tccattctgg cgccactacc a			
21 <210>	88 <211>	21 <212>	DNA <213>	Artificial Sequence <220> <223>
38D <400>	88 aatccattct gccactacca c			

21 <210>	89 <211>	21 <212>	DNA <213>	Artificial Sequence <220> <223>
41W <400>	89	ggtgccacta ccacagctcc t		
21 <210>	90 <211>	21 <212>	DNA <213>	Artificial Sequence <220> <223>
41M1 <400>	90	tggtgccact tccacagctc c		
21 <210>	91 <211>	21 <212>	DNA <213>	Artificial Sequence <220> <223>
41M2 <400>	91	tggtgccact gccacagctc c		
21 <210>	92 <211>	21 <212>	DNA <213>	Artificial Sequence <220> <223>
41M3 <400>	92	tggtgccact cccacagctc c		
21 <210>	93 <211>	21 <212>	DNA <213>	Artificial Sequence <220> <223>
41M4 <400>	93	ggtgccacta gcacagctcc t		
21 <210>	94 <211>	21 <212>	DNA <213>	Artificial Sequence <220> <223>
41M5 <400>	94	ggtgccacta tcacagctcc t		
21 <210>	95 <211>	21 <212>	DNA <213>	Artificial Sequence <220> <223>
41M6 <400>	95	ggtgccacta acacagctcc t		
21 <210>	96 <211>	21 <212>	DNA <213>	Artificial Sequence <220> <223>
41M7 <400>	96	gtgccactac aacagctcct t		
21 <210>	97 <211>	21 <212>	DNA <213>	Artificial Sequence <220> <223>
41M8 <400>	97	gtgccactac tacagctcct t		
21 <210>	98 <211>	21 <212>	DNA <213>	Artificial Sequence <220> <223>
41M9 <400>	98	gtgccactac gacagctcct t		
21 <210>	99 <211>	21 <212>	DNA <213>	Artificial Sequence <220> <223>

41D <400>	99	tggtgccact	acagctcctt	c	
21 <210>	100 <211>	21 <212>	DNA <213>	Artificial Sequence <220>	<223>
45W <400>	100	acagctcctt	ctctgagtgg	t	
21 <210>	101 <211>	21 <212>	DNA <213>	Artificial Sequence <220>	<223>
45M1 <400>	101	cacagctcct	actctgagtg	g	
21 <210>	102 <211>	21 <212>	DNA <213>	Artificial Sequence <220>	<223>
45M2 <400>	102	cacagctcct	gctctgagtg	g	
21 <210>	103 <211>	21 <212>	DNA <213>	Artificial Sequence <220>	<223>
45M3 <400>	103	cacagctcct	cctctgagtg	g	
21 <210>	104 <211>	21 <212>	DNA <213>	Artificial Sequence <220>	<223>
45M4 <400>	104	acagctcctt	gtctgagtgg	t	
21 <210>	105 <211>	21 <212>	DNA <213>	Artificial Sequence <220>	<223>
45M5 <400>	105	acagctcctt	atctgagtgg	t	
21 <210>	106 <211>	21 <212>	DNA <213>	Artificial Sequence <220>	<223>
45M6 <400>	106	acagctcctt	ttctgagtgg	t	
21 <210>	107 <211>	21 <212>	DNA <213>	Artificial Sequence <220>	<223>
45M7 <400>	107	cagctccttc	actgagtgg	a	
21 <210>	108 <211>	21 <212>	DNA <213>	Artificial Sequence <220>	<223>
45M8 <400>	108	cagctccttc	gctgagtgg	a	
21 <210>	109 <211>	21 <212>	DNA <213>	Artificial Sequence <220>	<223>
45M9 <400>	109	cagctccttc	cctgagtgg	a	



21 <210>	110 <211>	21 <212>	DNA <213>	Artificial Sequence <220> <223>
45D <400>	110	ccacagctcc tctgagtgg	a	
21 <210>	111 <211>	21 <212>	DNA <213>	Artificial Sequence <220> <223>
48W <400>	111	tctctgagt	gtaaaggcaa	t
21 <210>	112 <211>	21 <212>	DNA <213>	Artificial Sequence <220> <223>
48M1 <400>	112	ttctctgagt	agtaaaggca	a
21 <210>	113 <211>	21 <212>	DNA <213>	Artificial Sequence <220> <223>
48M2 <400>	113	ttctctgagt	tgtaaaggca	a
21 <210>	114 <211>	21 <212>	DNA <213>	Artificial Sequence <220> <223>
48M3 <400>	114	ttctctgagt	cgtaaaggca	a
21 <210>	115 <211>	21 <212>	DNA <213>	Artificial Sequence <220> <223>
48M4 <400>	115	tctctgagt	ataaaggcaa	t
21 <210>	116 <211>	21 <212>	DNA <213>	Artificial Sequence <220> <223>
48M5 <400>	116	tctctgagt	ctaaaggcaa	t
21 <210>	117 <211>	21 <212>	DNA <213>	Artificial Sequence <220> <223>
48M6 <400>	117	tctctgagt	ttaaaggcaa	t
21 <210>	118 <211>	21 <212>	DNA <213>	Artificial Sequence <220> <223>
48M7 <400>	118	ctctgagt	ggaaaaggcaat	c
21 <210>	119 <211>	21 <212>	DNA <213>	Artificial Sequence <220> <223>
48M8 <400>	119	ctctgagt	ggcaaaggcaat	c
21 <210>	120 <211>	21 <212>	DNA <213>	Artificial Sequence <220> <223>



48M9 <400> 120 ctctgagtgg gaaaggcaat c
21 <210> 121 <211> 21 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
48D <400> 121 ttctctgagt aaaggcaatc c
21 <210> 122 <211> 22 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
Exon-3F <400> 122 gatttgatgg agttggacat gg
22 <210> 123 <211> 22 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
Exon-3R <400> 123 tgttcttgag tgaaggactg ag
22 <210> 124 <211> 21 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
Long-3F <400> 124 aaaatccagc gtggacaatg g
21 <210> 125 <211> 21 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
Long-3R <400> 125 tgtggcaagt tctgcatcat c
21 <210> 126 <211> 21 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
BAT26-F <400> 126 tgactacttt tgacttcagc c
21 <210> 127 <211> 22 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
BAT26-R <400> 127 aaccattcaa catttttaac cc